

PCT/JP 99/05983

28.10.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

JP 99/5983

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年10月30日

出 願 番 号

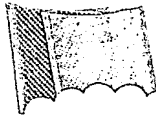
Application Number:

平成10年特許願第310422号

出 願 人

Applicant (s):

株式会社医学生物学研究所



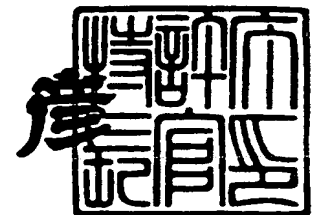
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3083771

【書類名】 特許願

【整理番号】 M3-007

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 チオレドキシンレダクターゼ I I

【請求項の数】 19

【発明者】

    【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株  
    式会社医学生物学研究所内

    【氏名】 田路 真悟

【発明者】

    【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株  
    式会社医学生物学研究所内

    【氏名】 矢野 実

【発明者】

    【住所又は居所】 長野県伊那市大字手良沢岡字大原 1063-103 株  
    式会社医学生物学研究所内

    【氏名】 玉井 克之

【特許出願人】

    【識別番号】 390004097

    【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】チオレドキシンレダクターゼ I I

【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列番号：2 または配列番号：4 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】配列番号：2 または配列番号：4 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2 または配列番号：4 のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】配列番号：1 または配列番号：3 のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 4】配列番号：2 または配列番号：4 のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。

【請求項 5】配列番号：1 または配列番号：3 のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。

【請求項 6】請求項 1-5 のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 7】請求項 1-5 のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。

【請求項 8】配列番号：1 または配列番号：3 のいずれかに記載の塩基酸配列からなる、請求項 7 に記載のcDNA。

【請求項 9】請求項 7 または 8 に記載したDNAが挿入されたベクター。

【請求項 10】請求項 9 のベクターを保持する形質転換体。

【請求項 11】請求項 10 の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1-5 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 12】請求項 7 に記載のcDNA若しくはその一部に対するアンチセンスDNA。

【請求項 13】 請求項 7 に記載の cDNA に特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】 以下に示す第 1 エキソンまたは第 2 エキソン、および第 3 - 第 19 エキソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードする DNA。

第 1 エキソン：配列番号：18

第 2 エキソン：配列番号：19

第 3 エキソン：配列番号：20

第 4 エキソン：配列番号：21

第 5 エキソン：配列番号：22

第 6 エキソン：配列番号：23

第 7 エキソン：配列番号：24

第 8 エキソン：配列番号：25

第 9 エキソン：配列番号：26

第 10 エキソン：配列番号：27

第 11 エキソン：配列番号：28

第 12 エキソン：配列番号：29

第 13 エキソン：配列番号：30

第 14 エキソン：配列番号：31

第 15 エキソン：配列番号：32

第 16 エキソン：配列番号：33

第 17 エキソン：配列番号：34

第 18 エキソン：配列番号：35

第 19 エキソン：配列番号：36

【請求項 15】 配列番号：37 で示される請求項 14 の DNA。

【請求項 16】 配列番号：18 - 配列番号：36 のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズする DNA であって、ヒト染色体 22q11.2 に特異的にハイブリダイズしうる DNA。

【請求項 17】 配列番号：37 に記載の塩基配列のうち、配列番号：18 - 配

列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。

【請求項18】下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、請求項2に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、請求項2に記載のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった請求項2に記載のタンパク質の量を決定する

【請求項19】下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質を請求項1-3に記載のタンパク質と接触させる工程、および

(b) 請求項1-3に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つ新規なタンパク質をコードする遺伝子、ならびにこのタンパク質そのものに関するものである。このタンパク質は、アポトーシス、がん化、あるいは炎症等のシステムに密接に関連している可能性が高く、治療薬や診断マーカーの研究材料として幅広い応用が期待される物質である。

【0002】

【従来の技術】

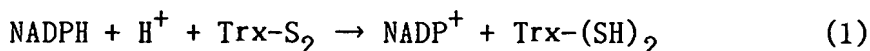
ウイルスの感染があったとき、宿主側の細胞がアポトーシスを起こす現象が知られている。この現象は、感染細胞を生体から排除しようとする防御機構のひとつと考えられている。これに対してウイルス側は、自身が増殖するための時間を稼

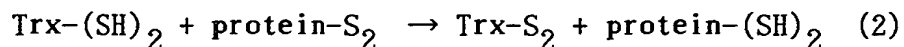
ぐためにアポトーシスの抑制システムを備えている。すなわち、ウイルスが産生するアポトーシス阻害タンパク質(Inhibitor of Apoptosis protein:IAP)は、宿主のアポトーシスを阻害する抗アポトーシスタンパク質のひとつである。その後、IAPはウイルスだけでなく高等動物においてもそのホモログの存在が確認された。ヒトのIAPホモログは、これまでにHIAP 1、HIAP 2、およびXIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)が報告されている。そのうちHIAP 1とHIAP 2は、TRAF2 (TNFR associated factor 2)と結合することが明らかにされた(Cell 83(7): 1243-52, 1995., Proc Natl Acad Sci U S A 94(19): 10057-62, 1997)。一方 XIAPに結合する因子は同定されていない。ヒトにおけるアポトーシスの制御機構に関与するXIAP の機能解析を進めるには、その結合因子を同定する必要がある。

一方、チオレドキシソレダクターゼ(以下、TxRと省略する)については次のようなことが明らかになっている。すなわち、チオレドキシソの生成を通じたDNA転写機構への関与と、がんの増殖への関与である。これまでに報告されている、知見を以下にまとめる。

### 【0003】

チオレドキシソレダクターゼ ;TxR(EC 1.6.4.5)はピリジンヌクレオチドジスルフィドオキシソレダクターゼ ファミリーの1つである。このファミリーには、グルタチオンレダクターゼ、リポアミド デヒドロゲナーゼ、トリパノチオン レダクターゼ、水銀イオン レダクターゼやNADPH ペルオキシダーゼが含まれる。これらのタンパク質は2量体を形成し、ジスルフィド結合をレドックス活性中心に持つ。フラビンアデニンジヌクレオチド(以下、FADと省略する)を補酵素とし、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸(以下NADPHと省略する)を利用し基質を還元する。チオレドキシソレダクターゼはNADPHをNADP<sup>+</sup>に酸化し、同時に基質である酸化型チオレドキシソ(-S<sub>2</sub>)を還元型チオレドキシソ(-SH)<sub>2</sub>に変換する(1)。還元型チオレドキシソはタンパク質の ジスルフィド(S-S)結合を還元し、自身は酸化型チオレドキシソになる(2)。なお、以下チオレドキシソはTrxと省略する。





Trxはレドックスタンパク質であり、生体内で還元状態を作り出す電子供与体として重要な作用を担っている。例えば、リボヌクレオチドレダクターゼ、メチオニンSルホキシドレダクターゼ(Annu.Rev.Biochem 54: 237-71. 1985.)、ビタミンKエポキシドレダクターゼ(Biochem.Biophys.Res.Comm.,155(3):1248-54.1988.)などの酵素の電子供与体である。またタンパク質のホールディングを触媒し、転写因子のDNA結合能を決定している。TrxによってDNA結合能が制御されている転写因子には、以下のような物質が知られている。

NF- $\kappa$ B (J.Biol.Chem. 268(15): 11380-8. 1993.) (Nucleic Acids Res. 20(15): 3821-30.1992.),

TFIIIC,

BZLF1(Oncogene 6(7): 1243-50. 1991.)

グルココルチコイド、

p53

また転写因子AP-1はRef-1によって還元されDNA結合能を有するが、このRef-1はTrxを介して還元される。

#### 【0004】

一方、TxRは、抗がん剤のターゲットとしても注目されている。たとえば分泌型Trxはサイトカイン様の作用を持つことが報告されており、特に還元型Trxは細胞増殖に必須であることが報告されている。この還元型Trxを生成するのがTxRである。興味深いことに、ある種の癌ではTrxの血中濃度が上昇している事が報告されており、TxRの蛋白量も増加していると報告されている。Trxのレドックス活性中心に変異を挿入し、癌細胞に過剰発現させたところ癌細胞の増殖がほぼ完全に抑制されたとの報告もある。このような背景から、癌細胞の増殖を停止させるために、TxRに対する阻害剤のスクリーニングが最近活発に行われている。抗癌剤であるキノンやニトロソウレア、細胞増殖を停止し、分化誘導促進剤であるレチノイン酸は、TxRを阻害する作用を合わせ持つ。

#### 【0005】

さて、TxRは、必須微量元素の一つであるSe(セレン)をSecys(セレノシステ



イン)として含有するタンパク質である。興味深いことにSecysは翻訳されうる21番目のアミノ酸で、終止コドンUGAによってコードされるというユニークな生合成機構を持っている。Secysは放射線防御作用や、抗癌作用を有することも報告されている。Secys含有タンパク質としてこれまでに、活性酸素種ヒドロペルオキシド (-OOH) をグルタチオンやTrx依存的に還元消去するグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、甲状腺ホルモン (チロキシン) 前駆体T4を活性型T3に変換するI型テトラヨードチロニン脱ヨード酵素、また機能が良くわかっていないものとして、10個のSecysを含有するセレノプロテイン Pや、筋肉中に存在する低分子量のSecys含有タンパク質セレノプロテイン Wが報告されている。すでに報告されているヒトTxRはCys-Secys-Gly-終止コドン (UAA)というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。最も研究が進んでいる牛のTxRをカルボキシペプチダーゼYで処理し、C-末端のSecysを除去したところ、活性がなくなったことから、このC-末端のSecysは活性に必須である事が報告されている (Zhong, L., E. S. Arn-er, et al. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. J Biol Chem 273(15): 8581-91.). 新しいセレノタンパク質の構造が明らかにされれば、セレノタンパク質の研究に貢献するものと思われる。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、XIAP結合タンパク質とこれをコードするDNAの単離を課題としている。更に本発明は、新規なヒトに由来するTxR活性を有するタンパク質と、それをコードするDNAの単離を課題としている。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、酵母2ハイブリッド法(yeast two hybrid system)を用いてXIAP結合蛋白質の探索を行った。その結果、ヒト胎盤cDNAライブラリーの中からXIAP結合蛋白質をコードする遺伝子の単離に成功した。そして、この遺伝子によってコードされるタンパク質がTxR活性を持つことを見出し、本発明を完成した。す

なわち本発明は、以下のタンパク質、これをコードするDNA、およびそれらの製造方法と用途に関する。

〔1〕 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

〔2〕 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを持つチオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

〔3〕 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、チオレドキシンレダクターゼ活性を有するタンパク質。

〔4〕 配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、XIAP結合活性を有するタンパク質。

〔5〕 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、XIAP結合活性を有するタンパク質。

〔6〕 〔1〕－〔5〕のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。

〔7〕 〔1〕－〔5〕のいずれかに記載のタンパク質をコードするcDNA。

〔8〕 配列番号：1または配列番号：3のいずれかに記載の塩基酸配列からなる、〔7〕に記載のcDNA。

〔9〕 〔7〕または〔8〕に記載したDNAが挿入されたベクター。

〔10〕 〔9〕のベクターを保持する形質転換体。

〔11〕 〔10〕の形質転換体を培養する工程を含む、〔1〕－〔5〕のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

〔12〕 〔7〕に記載のcDNA若しくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔13〕 〔7〕に記載のcDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つオリゴヌクレオチド。

〔14〕以下に示す第1エキソンまたは第2エキソン、および第3-第19エキソンを含み、チオレドキシンレダクターゼ活性を持つタンパク質をコードするDNA。

第1エキソン：配列番号：18

第2エキソン：配列番号：19

第3エキソン：配列番号：20

第4エキソン：配列番号：21

第5エキソン：配列番号：22

第6エキソン：配列番号：23

第7エキソン：配列番号：24

第8エキソン：配列番号：25

第9エキソン：配列番号：26

第10エキソン：配列番号：27

第11エキソン：配列番号：28

第12エキソン：配列番号：29

第13エキソン：配列番号：30

第14エキソン：配列番号：31

第15エキソン：配列番号：32

第16エキソン：配列番号：33

第17エキソン：配列番号：34

第18エキソン：配列番号：35

第19エキソン：配列番号：36

〔15〕配列番号：37で示される〔14〕のDNA。

〔16〕配列番号：18-配列番号：36のいずれかに記載の塩基配列またはその部分配列にハイブリダイズするDNAであって、ヒト染色体22q11.2に特異的にハイブリダイズしうるDNA。

〔17〕配列番号：37に記載の塩基配列のうち、配列番号：18-配列番号：36に記載された塩基配列を除く部分、またはその一部とハイブリダイズしうるDNA。

〔18〕下記の工程を含む、XIAPとその結合因子との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、〔2〕に記載のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、〔2〕に記載のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった〔2〕に記載のタンパク質の量を決定する

〔19〕下記の工程を含む、チオレドキシンレダクターゼIIの酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質を〔1〕－〔3〕に記載のタンパク質と接触させる工程、および

(b) 〔1〕－〔3〕に記載のタンパク質のチオレドキシンレダクターゼ活性の変化を観察する工程

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明者らが得た新規なタンパク質TxRII $\alpha$ およびTxRII $\beta$ のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：2および配列番号：4に、そしてそれをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1および配列番号：3にそれぞれ示した。なお、以降本明細書においてはTxRII $\alpha$ とTxRII $\beta$ の両方を同時に含む用語としてTxRIIsを用いることとする。このアミノ酸配列は、ヒト胎盤のcDNAライブラリーをもとに、2ハイブリッド法を応用してスクリーニングし、構造決定した新規な遺伝子に基づいて推定した配列である。2ハイブリッド法は、タンパク質の相互作用を高い感度で確認するための方法である。その原理については実施例中で触れるように、マーカー遺伝子の発現を指標に、相互作用するタンパク質の組み合わせをスクリーニングする方法である。本発明者らは、XIAPに対する結合活性を持った物質の探索にこの方法を応用して新規な因子を発見し、その構造を明らかにした。

【0009】

本発明によって提供されるTxRIIsをコードする遺伝子の染色体上の位置は、22

q11.2であることが確認された。TxRIIsはいずれもこの領域の70kbpの中に19のエキソンに分かれて存在していた。染色体上へのマッピングはデータベースの検索によって行ったが、染色体のこの位置に、TxR活性を持ったタンパク質の遺伝子が存在していることはまったく知られていなかった。TxRII $\alpha$ とTxRII $\beta$ とは、2番目のエキソン以降はまったく同じ構造を持つことから、TxRIIのオルターネイティブスプライシングフォームであると断定した。すなわち、TxRII $\alpha$ の1番目のエキソンが下記の第1エキソン（配列番号：18）となっており、TxRII $\beta$ の1番目のエキソンは第2エキソン（配列番号：19）となっている。両者の2番目のエキソン以降は、第3エキソン（配列番号：20）-第19エキソン（配列番号：36）で共通である。

#### 【0010】

興味深いことにこのTxRII遺伝子の近傍には、Di George症候群や神経線維腫症などの原因遺伝子がマップされており我々の発見したTxRIIsも何らかの遺伝病に関与している可能性を否定できない。更に注目すべきことにTxRII $\alpha$ のエキソン1は、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ（EC 2.1.1.6、以下COMTと省略する）のプロモーター領域に重なっていた。またCOMTも染色体上22q11.1→11.2マップされており、その転写方向はTxRIIに対して逆向きであった。つまりTxRII $\alpha$ が転写された場合、COMTのmRNAに対してアンチセンスに作用して、COMTの発現を阻害する可能性が示唆された。これが精神分裂症やパーキンソン病の原因である可能性もある。またこの事実から、TxRII $\alpha$ のエキソン1のセンス鎖DNAを過剰発現させることによって、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドを、またはセンスの核酸アナログを投与することで、効率的にCOMTの転写を阻害できると考えられる。

#### 【0011】

本発明によって提供されるゲノムDNAにおけるエキソンとイントロンの位置に関する情報は、これらの疾患と遺伝子異常との関連性について研究を進める上で不可欠である。またこれらの遺伝子異常を診断するためのプローブの提供を可能とするものでもある。ゲノム上に占める、各エキシンの位置について表1に示す。なお、以下に示す位置を示す番号は配列番号：37に示したゲノムの塩基配列

における5'末端を1としたときの番号である。更にこれらの情報に基づいて、たとえば各エクソンに特異的にハイブリダイズするDNAは、イントロン部分の増幅のためのプライマーとして利用することができる。逆に配列番号：37に記載した塩基配列のうち、各エクソンを除いたイントロン領域にハイブリダイズするDNAは、PCRによるエクソンの増幅に利用される。このようなプライマーは、イントロンやエクソンの異常を知るために不可欠なツールである。遺伝子疾患にはタンパク質をコードする領域の異常のみならず、イントロンの異常によってスプライシングが正しく行えないことが原因となっているケースも存在することから、このようなプライマーは遺伝子疾患の解明に有用である。更に、エクソンにハイブリダイズすることができるDNAはプローブとして有用である。特にこれらのDNAの中で染色体22q11.2に特異的にハイブリダイズするDNAは、配列番号：37に示す本発明によるゲノムDNAのクローニングのためのプローブとして有用である。すなわち、ヒトのジェノミックライブラリーをソースとしてこれらのプローブでスクリーニングを行えば、配列番号：37に示すゲノムDNAの単離が可能である。プローブやプライマーとして利用する場合、本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも15ヌクレオチドから構成され、望ましくは15-200ヌクレオチド、より望ましい条件としては25-100ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。

【0012】

【表1】

エクソン	塩基番号	スプライシング部位の構造		配列番号
		3'側	5'側	
Exon 1	1- 103	agcag/GTA		18
Exon 2	9247- 9446	ccaag/GTG	CAG/caggtc	19
Exon 3	10706-10774	ggagg/GTA	CAG/ccgccc	20
Exon 4	22205-22261	ccaag/GTA	CAG/gcacc	21
Exon 5	22800-22944	gactg/GTA	CAG/gagga	22

Exon 6	23587-23661	gacag/GTA	CAG/aaaag	2 3
Exon 7	25961-26039	aagag/GTG	CAG/attct	2 4
Exon 8	26529-26591	cgcac/GTG	CAG/atcga	2 5
Exon 9	30358-30428	aaaac/GTA	CAG/gttgg	2 6
Exon 10	43016-43035	cagct/GTA	CAG/atgtg	2 7
Exon 11	43954-44045	accag/GTA	CAG/caaat	2 8
Exon 12	46503-46677	catag/GTA	CAG/gtcga	2 9
Exon 13	58623-58759	tggag/GTA	AAG/gggCg	3 0
Exon 14	61367-61462	acaat/GTG	CAG/gttct	3 1
Exon 15	61813-61905	ttgag/GTG	CAG/gtcta	3 2
Exon 16	63647-63718	taaag/GTG	CAG/atggt	3 3
Exon 17	63897-63994	atcaa/GTA	CAG/gtgtg	3 4
Exon 18	64850-65044	cccag/GTA	CAG/gatgg	3 5
Exon 19	66277-66566	-		3 6

#### 【0013】

配列番号：2で示されるアミノ酸配列は、データベース検索によると公知のヒトTxRに対して55%の相同性を示した。またヒトグルタチオンレダクターゼに対しては38%の相同性を示した。特に、レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心においては完全に相同に保存されていた。本発明によるTxRII $\alpha$ と、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを図1に示した。これらのデータに基づいて本発明者らは配列番号：2のアミノ酸配列を持つタンパク質をTxRII $\alpha$ と名づけた。しかし公知のヒトTxRにはXIAPとの結合活性が見られないことから、本発明の蛋白質は新規である。またアミノ酸配列においても、両者のホモロジーは60%に満たない。したがって、両者は明らかに異なった蛋白質であり、ヒトTxRが本発明によるTxRII $\alpha$ やTxRII $\beta$ の構造や機能を予測させるものではない。

#### 【0014】

1995年に報告されたヒトチオレドキシソレダクターゼは3'側に存在する非翻

訳領域（以下3' UTRと省略する）にAUUUAという配列を含むことが報告されている。このAUUUAは、mRNAの不安定性に寄与していると考えられ、この配列を3' UTRに含むことでmRNAが素早く分解されることが報告されている。このような配列は、サイトカインやプロトオンコジーンにおいても報告されており、そしてこれらのタンパク質が刺激により瞬時に増加し、消失することは周知のことである。これらの事実から推察すると、先に報告されたヒト チオレドキシンレダクターゼは、ある何らかの刺激によって一時的に転写翻訳され、その後速やかに分解され、その作用はごく一時的なものに限られると考えられる。それに対し、本発明のTxRIIsの3' UTRにはこのような配列が存在せず、どちらかといえばTxRIIsが恒常的に生体内のレドックス制御に関与していると考えられる。従ってTxRIIsの阻害剤や促進剤は、これまでに報告されているTxRに対する阻害剤とは、特異性、阻害効果、治療薬として全く異なるものとなる可能性が大きいと考えられる。したがって、本発明によって明らかにされたTxRIIsに関する知見は、生体内のレドックス制御に関与する薬剤の開発において大きな意味を持つものである。

## 【0015】

本発明によるタンパク質は、配列番号：2や配列番号：4に明らかにされたもののみならず、同等の生理活性を持つ変異体をも含むものである。すなわち本発明は、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなりXIAP結合活性を有するタンパク質すべてを含む。あるいはまた、配列番号：2または配列番号：4のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入したアミノ酸配列からなり、しかも望ましくは全体として前記アミノ酸配列に対して60%以上のホモロジーを備え、TxR活性を有するタンパク質すべてを含む。

## 【0016】

配列番号：2または配列番号：4として記載したアミノ酸配列からわかるように、本発明によるTxRIIsはセレノシステインを分子内に含むセレノ蛋白質である



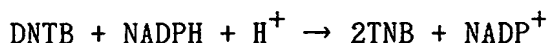
。一方、既に報告されているヒトTxRはCys-Secys-Gly-終止コドン (UAA)というアミノ酸配列でSecysをコードすることが報告されている。しかも、ウシTxRではこのC末端のCys-Secys-Gly という配列がTxRの活性発現に必要な領域とされている。したがって本発明によるヒトTxRIIsにおいても、TxRの活性発現にこの領域が重要な意味を持つことが推測される。

【0017】

生理活性を維持しながらアミノ酸配列に変異を加える方法は公知である。たとえば、ランダム突然変異を用いて変異体を作製する方法としてchemical mutagenesis法(Myers RM, et al. Methods Enzymol., 1987;155:501-527)が知られている。この方法では、まず注目している遺伝子の1本鎖DNAに塩基修飾試薬を加えてランダムに変異を導入する。次いで得られた1本鎖DNAを鋳型として、PCRにより適当なプライマーを使って2本鎖DNAを合成しクローニングする。変異体のライブラリーから所望の活性を持った発現産物を与えるクローンを選択すれば、目的とする変異体を得ることができる。他方、標的塩基を決めて変異体を作成する方法としては、突然変異オリゴヌクレオチドプライマーを使って、注目している遺伝子を鋳型にPCRを行うことで変異を導入する方法(Ito W, et al, Gene 1991 Jun 15;102(1):67-70)も公知である。なおアミノ酸配列の変異は人工的な操作のみならず、自然な状態でも生じることがある。本発明における変異体とは、TxR活性、あるいはXIAP結合活性を維持している限り、このような自然に生じた変異体も含むものである。

【0018】

TxR活性を確認する方法としては、たとえば次の2つの方法が知られている(Holmgren, A. et al. Methods Enzymol. 252:199)。まず、5,5'-ジチオビス(2-ニトロベンゾイックアシッド) [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid; DTNB) のような適当なSH指示薬を用い、TxR活性によって生じる5-メルカプト-2-ニトロベンゾイックアシッド(5-mercapto-2-nitrobenzoic acid; TNB)を412nmのチオール吸収で測定する方法が公知である。この反応は以下のように示される。



【0019】

TxR活性のもう一つの指標は、TxR活性によって生じた還元型TrxがインシュリンのSS結合を切断するので、このときに生じる変化を追跡して酵素活性を知る、いわゆるインシュリンアッセイと呼ばれる手法である。指標となる変化には、補酵素NADPHの酸化による340nmの吸収の減少や、インシュリンの還元に伴って生じるチオール基の412nmにおける吸収が利用される。TxRによる還元型Trxの生成過程については既に述べたとおりである。

# 【0020】

一方、XIAP結合活性については、配列番号：2または配列番号：4に記載したアミノ酸配列を持つ天然型のTxRII $\alpha$ あるいは $\beta$ を基準として、その結合活性と機能的に同等なものであれば良い。機能的に同等な物質のスクリーニング方法として、具体的にはたとえば以下のような方法を示すことができる。すなわち、XIAPとその結合物質との結合を抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法であって、次の工程(a)または(a)'、および(b)を含む方法である。

(a) スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを、本発明のタンパク質と同時に接触させるか、または

(a)' スクリーニングの対象となる候補物質とXIAPとを接触後に、本発明のタンパク質を更に接触させ、

(b) XIAPに結合したおよび／またはしなかった本発明のタンパク質の量を決定する

より具体的には、実施例7-5) 阻害剤アッセイとして示した方法に準じた方法を示すことができる。候補化合物の希釈系列を試料とし、希釈系列依存的に吸光度の低下が観察されれば、その候補化合物には結合阻害活性があると判断される。あるいはまた、コンビナトリアルケミストリー(combinatorial chemistry)を応用することもできる。すなわち、候補化合物のライブラリーを用意し、これに本発明のタンパク質をXIAPとともに加えて、候補化合物に結合するXIAPを追跡すれば、TxRIIsの拮抗阻害物質をスクリーニングすることができる。逆に、候補化合物に結合するTxRIIsを指標とすれば、TxRIIsのXIAPに対する結合をブロックする化合物をスクリーニングすることになる。

## 【0021】

本発明によるスクリーニング方法において、前記本発明のタンパク質とは、XIAPとの結合活性ドメインを持つものであれば良い。すなわち、必ずしも配列番号：2や配列番号：4に示すアミノ酸配列を持った完全な分子でなくても良い。候補化合物や本発明のタンパク質の結合を観察するためには、これらのタンパク質を観察可能な分子で修飾しておく。観察可能な分子としては、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質、および酵素活性物質等を挙げられる。前記コンビナトリアルケミストリーを応用した場合には、候補化合物のライブラリーを固相上に固着した状態にしておくと、反応液の分離と洗浄に続く標識の測定までの操作を容易に行えるので便利である。

なおこれらの方法は、本発明における変異体のスクリーニングに有用なばかりでなく、XIAPと本発明のタンパク質との結合を阻害する化合物の一般的なスクリーニング方法として利用することができる。このスクリーニング方法を通じてスクリーニングされた化合物は、XIAPが関与するシグナル伝達系を制御しうることから、本発明によって提供されるタンパク質、その抗体、類似物質などには、アポトーシス促進を通じてがんの抑制やウイルス感染細胞における細胞死の誘導等の効果が期待できる。

## 【0022】

加えて、本発明のTxRIIsを利用し、その酵素活性を促進、または抑制する活性を有する化合物をスクリーニングする方法が提供される。この方法は、以下の工程によって構成される。

- (a) スクリーニングの対象となる候補物質をTxRIIsと接触させる工程、および
- (b) TxRIIsのTxR活性の変化を観察する工程

このスクリーニングに用いられるTxRIIsは、必ずしも完全な分子である必要はなく、TxRIIsの酵素活性を維持する断片を利用することもできる。TxR活性の測定は、前記のような方法に基づいて行えば良い。TxRIIsの構造が公知のTxRIとは異なっていることから、一方の活性に影響する化合物が他方に作用するとは限らない。したがってTxRIIsの酵素活性に影響を与える物質をスクリーニングする方法は、TxRIIsの酵素活性に特異的な阻害剤や活性化剤を明らかにするために、あ

るいはTxRIIsとTxRIに同じように作用する化合物を得るために不可欠な技術である。

TxRが生体内のレドックスを制御していることから、本発明によるスクリーニング方法に基づいて得ることができるTxRIIsの阻害剤には、抗がん剤や自己免疫疾患の治療剤としての用途が期待できる。たとえば、自己免疫疾患であるリウマチの一般的な治療薬として利用されている有機金化合物は、セレノプロテイン、中でもTxRの阻害活性が高いとされている。したがって、TxRIIの阻害作用を持つ化合物には、類似の薬理活性を期待できる(Stephan Gromer et al., J. Biol. Chem. Vol. 273, No. 32, 20096-20101, 1998)。また、TxRの活性阻害を通じて薬理活性を期待するのであれば、公知のTxRのみならずTxRIIに対しても有効な化合物を選択する必要があることから、本発明によって提供されるTxRIIの活性に影響を与える化合物のスクリーニング方法は有用である。

#### 【0023】

本発明のタンパク質は、TxRII $\alpha$ 、あるいは $\beta$ を発現している細胞から抽出・精製することによって得ることができる。細胞には、目的とするタンパク質を高度に発現しているものを選択するのが有利である。目的とするタンパク質をコードするDNAの塩基配列が与えられているので、この配列に基づくプローブを使って、標的遺伝子を高度に発現している細胞株をスクリーニングする方法は当業者が日常的に行っている。実施例に示すように、本発明によるTxRIIsは、多くの培養細胞が発現しているので、これらの培養細胞を原料とすれば良い。また、細胞培養物から種々の抽出法やタンパク質の精製法を組み合わせることで目的とするタンパク質を純化する方法も、当業者が経験的に選択することができる。具体的には、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イムノアフィニティクロマトグラフィーなど様々な精製方法が利用できる。

こうした天然材料からの精製とは別に、遺伝子工学的な手法によって本発明によるタンパク質を得ることもできる。たとえば配列番号：1や配列番号：3に示した塩基配列を基に、その翻訳領域を適当なベクターに組み込んで発現ベクターを構築する。そして、この発現ベクターを適当な宿主にトランスフェクトすれば目的のTxRIIを組み換え体として発現させることができる。

## 【0024】

加えて本発明は、前記本発明によるタンパク質をコードするcDNAを提供する。本発明が開示する配列番号：1または配列番号：3に示す塩基配列を持つDNAは新規である。本発明のcDNAは、たとえば配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて設計したプローブを使ってcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、目的とする遺伝子を得ることができる。この他、配列番号：1または配列番号：3に記載した塩基配列を基にプライマーを合成し、cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行っても、本発明による遺伝子を得ることができる。プローブやプライマーの設計と調製は、本発明のcDNAの塩基配列に基づいて当業者に公知の方法で行うことができる。PCR用のプライマーにおいては、増幅しようとするセグメントの5'末端付近と、3'末端付近の配列を選択することになる。このときに各プライマーの5'側に制限酵素認識配列を付加しておくこと、ベクターへの挿入に便利である。配列番号：1、あるいは配列番号：3に示した塩基配列は、いずれも約2kbpの長さを持っている。この程度の長さであれば、一組のプライマーを利用しcDNAを鋳型として1度のPCRで全領域の増幅が可能である。得られる増副産物は、電気泳動で確認することにより標的遺伝子の高感度な検出を可能とする。あるいは増副産物をベクターに組み込むことによって発現ベクターを構築することができる。実施例に用いた市販のライブラリーには、本発明によるTxRIIsの全長cDNAが含まれている。したがって、これを鋳型としてPCRを行えば本発明のcDNAを容易に得ることができる。あるいはTxRIIsを発現していることを示した各種細胞株のmRNAをもとにRT-PCRを行うことによっても、本発明のcDNAを得ることができる。

## 【0025】

配列番号：1、または配列番号：3に記載した塩基配列に基づいて活性型のTxRIIsの発現ベクターを構築するとき、そのCDSと並んで重要な構成要素となるのが3' UTRである。3' UTRのうち、配列番号：1の1780-1909、そして配列番号：3の1883-2012に相当する部分（配列番号：5、130bp）は共通の塩基配列で構成されている。この部分が、セレノシステインを含んだ完全な形のTxRIIsとして発現させるために必要となる。mRNAにおけるこの領域に相当する部分によって構成

されるステムループ構造により、通常は停止コドンであるUGAがセレノシステインに翻訳される。先に述べたとおり、セレノシステインはTxRの酵素活性に必須のアミノ酸と考えられている。したがって、本発明に基づく発現ベクターには、この領域を含む形でインサートを組み込む必要がある。ただし、本発明のTxRIIsにTxR活性を期待しないのであれば、この領域は必須ではない。たとえば、特定の領域のみからなるTxRIIsのドメインペプチドの発現を目的とするようなケースでは、必要なアミノ酸配列をコードする塩基配列のみを発現可能な形で組み込むことによって目的のタンパク質を得ることができる。このようにして得られるドメインペプチドには、TxRの酵素活性は期待できないが、たとえば、本発明によるTxRIIsを認識する抗体作成のための免疫原として利用することは可能である。あるいは、XIAPとの結合を担う領域を選択すれば、本発明に基づくXIAPとの結合活性を備えた変異体の作成を可能とする。

#### 【0026】

本発明によるDNAは、配列番号：1および配列番号：3に示した塩基配列そのもので構成されるもののみならず、その変異体をも含む。本発明に基づくDNAの変異体とは、次の2つに大別される。すなわち、第一に、先に述べたアミノ酸配列に変異を持つ本発明によるタンパク質のすべてについて、それをコードする塩基配列を備えたDNAは、本発明に基づくDNA変異体に他ならない。この種の変異体をより具体的に説明すれば、TxRIIsとしての活性を維持する範囲内でアミノ酸配列に変異を加えた全ての変異体をコードするDNAは、配列番号：1あるいは配列番号：3にハイブリダイズすることができるかどうかとは無関係に本発明によるDNAに含まれる。通常1つのアミノ酸に対するコドンには複数の配列が対応している（縮重）ため、与えられたアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列には理論上は天文学的な数に上る種類の配列が想定できる。この理由により、本発明によるDNAの塩基配列は特定配列との相補性とは無関係に特定されなければならないのである。

#### 【0027】

第2に、配列番号：1または配列番号：3とハイブリダイズすることができ、かつTxRIIsとしての活性を維持するタンパク質をコードするDNAは、本発明によ

るDNAに含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。本発明において明らかにされたcDNAの塩基配列に基づいて、この塩基配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを得ることができる。本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイズを達成するために少なくとも15ヌクレオチドから構成され、望ましくは15-200ヌクレオチド、より望ましい条件としては25-100ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドとする。このようなオリゴヌクレオチドは、プローブやプライマーとして利用される。与えられた配列をもとに、その配列に特異的にハイブリダイズするプローブを設定することは当業者が日常的に行っていることである。特異的なハイブリダイズを達成する塩基配列は、目的とする標的塩基配列に対して必ずしも完全に相補的である必要は無い。ストリンジェントな条件の元で、必要な特異性を達成できれば、配列の変異は許容される。設定された塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。プライマーとして利用する場合には、相補鎖の合成原理に応じて複数の領域を設定することができる。たとえばPCRのためのプライマーであれば、合成の対象となるセグメントの5'側と3'側の両端を規定する領域がプライマーとして選択される。本発明によるオリゴヌクレオチドは、基本的なPCRのみならず、RNAを鋳型とするRT-PCR、増幅領域をネストさせて高感度な検出を可能とするネステッドPCR、あるいはcDNAの合成等、様々な相補鎖合成反応に応用することができる。

#### 【0028】

たとえばTxR1IsのcDNA増幅用プライマー、あるいは3' UTR増幅用のプライマーとして次の塩基配列を示すことができる。以下に示すTxR1IsのcDNA増幅用プライマーを用いれば、本発明によるTxR1Isを公知のTxRと識別することが可能で、後者のcDNAを特異的に増幅することができる。

TxRII  $\alpha$  のforwardプライマー（配列番号：13）：

5'-ACGATGGCGGCAATGGCGGTG-3'

TxRII  $\beta$  のforwardプライマー（配列番号：14）：

5'-ACCATGGAGGACCAAGCAGGT-3'

TxRIIsのreverseプライマー（配列番号：15）：

5'-TTACCCTCAGCAGCCTGTCAC-3'

3' UTR増幅用forwardプライマー（配列番号：16）：

5'-GCGCCATCCCTGCAGGCCAGG-3'

3' UTR増幅用reverseプライマー（配列番号：17）：

5'-CACACTTCAGAAAAAGTACCC-3'

【0029】

本発明に基づくオリゴヌクレオチドは、TxRIIsの発現を抑制するアンチセンスDNAとしても利用することができる。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、複数の要因が存在する（平島および井上「新化学実験講座2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」，日本生化学会編，東京化学同人，pp.319-347，1993）。いずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制することも可能である。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、発現を抑制すべき細胞へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換すべき細胞が持つ内在性TxRIIs遺伝子（若しくはその相同遺伝子）またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%、最も好ましくは95%の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少



なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。

#### 【0030】

本発明は、本発明に基づくタンパク質を認識する抗体を提供する。本発明の抗体は、先に述べたような方法で得たタンパク質やその断片を公知の方法によって免疫することによって調製することができる。免疫に当たってはFCAのようなアジュバントを免疫抗原と混合し、適当な免疫スケジュールで免疫動物の皮下に免疫する。免疫動物には、TxRの構造がヒトとできるだけ異なっているものを選択すると高い免疫刺激を期待できる。抗体は、免疫動物の血清から精製したポリクローナル抗体のみならず、抗体産生細胞のクローニングによって得ることができるモノクローナル抗体とすることもできる。免疫動物の抗体産生細胞を回収し、クローニングを可能とする培養細胞株と融合させてモノクローナル抗体を産生する細胞株を樹立する方法は、当業者によって自明である。こうして得られる抗体は、本発明によるTxRの免疫学的な検出や、精製に利用することができる。

更に、異種動物由来のTxRIIsを認識する抗体産生細胞が持つ抗体の可変領域の遺伝子を利用し、これをヒト化することも可能である。すなわち、たとえばマウスの抗体可変領域にヒト抗体の定常領域を備えたキメラ抗体を遺伝子組み換えによって作り出すことができる。あるいは超可変領域のみをヒト抗体のフレームワークに組み込んだ、いわゆるヒト化抗体(humanaized antibody)を得る方法も公知である。これらのヒト化した抗体は、ヒトに投与しても免疫学的な反応を起こしにくいのでin vivoにおいて安全に、しかも効果的に利用することができる。以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

#### 【0031】

##### 【実施例】

本発明において、汎用されている手法については全てJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに従って行った。

【0032】

1. XIAPのPCRによるクローニング

1-1) プライマー作製

ヒトのXIAP遺伝子全長を、PCR法を用いて単離するために、以下の2つのプライマーを合成した。

・ 5' プライマー (XIAP 2486 (32mer))

5'- GCG GGA TCC ATG ACT TTT AAC AGT TTT GAA GG -3'

\* 5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(GGATCC)は制限酵素BamH I サイト。

・ 3' プライマー (XIAP 2482 (32mer))

5'- GCG CTC GAG CTA CTA TAG AGT TAG ATT AAG AC -3'

\* 5' 端3塩基(GCG)は制限酵素処理を円滑に行なうためのもの。

5' 端4塩基目から9塩基目まで(CTCGAG)は制限酵素Xho I サイト。

1-2) PCR

ヒトT細胞由来Jurkat細胞由来のcDNAを鋳型DNAとして用い、ヒトXIAP遺伝子全長をPCR法で増幅した。PCRは、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラムで行った。

a) 94℃ 5min.

b) 94℃ 1min., 58℃ 3min., 72℃ 3min.を1サイクル

c) 94℃ 1min., 65℃ 1min., 72℃ 2min.を35サイクル

d) 72℃ 10min.

【0033】

1-3) pAS2-1ベクターへのPCR産物のクローニング

i) PCR産物の精製

PCR後、増幅されたDNA断片を 1 % アガロース電気泳動によって確認した。このDNA断片を制限酵素BamH I、Xho Iで処理した。制限酵素処理したDNA断片を 1 % アガロースで電気泳動後、切り出し、ガラスマトリクス法 (BI0101社、GeneClea  
n) により精製した。

【0034】

## ii) ベクターの作製

pAS2-1ベクターは、CLONTECH社のMATCHMAKER Two Hybrid System (商品名) で用いられるbaitベクターで、GAL4-DNA-BD (GAL4蛋白質のDNA Binding Domain) をコードする配列の下流にマルチクロニング部位 (MCS) が存在する。なお、2ハイブリッド法におけるbait (おとり) とは、未知の結合因子を探し出すためのプローブとして機能する既知のタンパク質を発現する側のベクターを意味する。GAL4-DNA-BDとPCR産物の翻訳フレームを合わせるため、このMCSの制限酵素 Nde IサイトをNde Iで切断後、常法により平滑末端とし、セルフライゲーションさせ2フレームずれたベクターpAS $\Delta$ NdeI(+2)を得た。これを制限酵素BamH I、Sal Iにより処理した断片を、PCR産物と同様の方法で精製した。精製したPCR産物、pAS2-1 $\Delta$ NdeIベクターの断片をライゲーションした。精製したPCR産物、pAS2-1 $\Delta$ NdeIベクターはモル比が1になるよう混和し、T4 DNA ライゲースを用い16℃で1時間反応させた。

【0035】

## iii) 大腸菌のトランスフォーメーション

常法(Hanahan, D.1983 Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, J. Mol. Biol 166 : 557)によりコンピテント化された大腸菌株DH5 $\alpha$ に、ライゲーション反応液を加え、穏やかに混和し氷上に30分静置後、42℃温水中で 90 秒熱ショックを加え、再度氷上に2分静置し、SOC培地を加え37℃で1時間震盪培養した。、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLBプレートにスプレッドし、37℃で一晩培養した。

【0036】

## iv) アルカリ-SDS法によるDNAの回収およびインサートの確認

プレートから複数のコロニーを拾い、LB-アンピシリン培地で37℃一晩培養した。培養した大腸菌から、アルカリ-SDS法を用いてプラスミド DNAを回収した。回収したプラスミド DNAを適当な制限酵素で切断し、アガロース電気泳動によりベクター内に目的のPCR産物が組み込まれていることを確認した。

【0037】

## v) シークエンスの確認

回収したDNAをポリエチレングリコール沈殿法により精製し、ベクター内のPCR産物を、サンガー法に基づき蛍光シーケンサー（PERKINELMER）により確認した。これによりpAS $\Delta$ NdeI(+2)ベクターにヒトのXIAP遺伝子全長が組み込まれたpAS $\Delta$ NdeI(+2)-XIAP のプラスミドDNAを得た。

【0038】

## 2. 2ハイブリッドスクリーニング

細胞内情報伝達機構の解析や高度な細胞機構の研究において、タンパク質間の相互作用を検出することや、既知のタンパク質と相互作用する未知あるいは既知の分子を同定することは非常に重要である。2ハイブリッドスクリーニングシステムは、2つの遺伝子のコードするタンパク質の相互作用の検出、あるいはある遺伝子産物と相互作用する分子のクローニング方法として注目を集めている。この方法は2つの遺伝子産物をそれぞれ転写因子のDNA結合部位（GAL4-DNA-BD）と転写活性化部位（GAL4-AD）に融合させ、両者の相互作用を転写活性を指標にして検出する。GAL4-DNA-BD融合蛋白質とGAL4-AD融合蛋白質を酵母の核内で同時に発現させる。両者が相互作用する場合、GAL4プロモーターを上流に持つHIS3遺伝子、lac Z遺伝子の転写翻訳が起こることが期待される。すなわち両者の蛋白質の相互作用がある場合のみ、その酵母は、ヒスチジンを除いた寒天培地上で生育が可能になり、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（以下、 $\beta$ -Galと省略する）活性がX-galを基質として検出可能になる。この様に2ハイブリッドスクリーニングシステムは、タンパク質を精製せずに2つの遺伝子産物の相互作用が酵母核内という *in vivo* の条件下で判定できるという優れた特性を有している。しかしながら相互作用を示さずにGAL4プロモーターからの転写を起すタンパク質のスクリーニングは不可能である。そこで、GAL4-DNA-BD融合蛋白質のみでlac Z遺伝子が発現しない、すなわち $\beta$ -gal活性がないことを確認する事が非常に重要な事である。2ハイブリッドスクリーニングはCLONTECH社のMATCHMAKER 2ハイブリッド法 2を用い、実験方法は全てこのプロトコールに従った。

【0039】

### 2-1) pray用のライブラリーDNAの精製

CLONTECH社より購入したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryをスクリーニ

ング用のライブラリーに用いた。このライブラリーはpACT2ベクターで作製されており、GAL4-AD (GAL4蛋白質のActivation Domain) をコードする配列の下流にMCSがあり、このMCSにcDNA断片が挿入されている。2ハイブリッド法において、未知の結合因子を含むと思われるライブラリーをprayと呼ぶ。直径150mmのLBアンピシリンプレート100枚に1枚あたり約20,000個のコロニーをで30℃で一晩培養し、菌体をLBアンピシリン液体培地で30℃で4時間培養した。集菌した大腸菌からプラスミド DNAをポリエチレングリコール沈殿法により回収精製した。

【0040】

2-2) 融合タンパク質の発現確認と $\beta$ -gal活性がないことの確認  
構築したpAS $\Delta$ NdeI(+2)-XIAPで酵母を形質転換し、XIAPがGAL4-DNA-BD融合蛋白質として発現すること、ならびにGAL4-DNA-BD融合XIAP(bait)が単独でGAL4プロモーターを活性化し、lac Z遺伝子が発現しないことを確認した。

【0041】

酢酸リチウム法(Gietz, D., Jean, A., Woods, R. A., & Schiestl, R. H. 1992, Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acid Res. 20:1425)によりコンピテント化された酵母Y190に、pAS $\Delta$ NdeI(+2)-XIAPのプラスミド DNAを用いて形質転換した。形質転換により得られたコロニーを、SD/-Trp液体培地で30℃ 3日間培養した。培養後に酵母菌体を遠心分離により集め、尿素/SDS蛋白抽出バッファーを用いて常法(Printen, J. A. & Sprague, G. F., Jr. (1994) Protein interactions in the yeast pheromone response pathway : Step 5 interacts with all members of the MAP kinase cascade. Genetics 138 : 609-619)により酵母よりタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによりタンパク質を泳動後、PVDFメンブレンに蛋白質をブロッティングした。anti-GAL4 DNA binding domain monoclonal antibody (CLONTECH社製) と anti-XIAP ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより、GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質が発現していることを確認した。

【0042】

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を生

育させたプレートに、滅菌したナイロントランスファーマンブレン (Amersham社製、Hybond-N+) をのせ、コロニーをメンブレンにトランスファーした。このメンブレンを液体窒素に10秒間浸した後、室温に戻し、コロニーがついている面を上にし、Z-buffer / X-gal 溶液 (100ml Z-buffer (16.1g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O、5.50g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O、0.75g/L KCl、0.246g/L MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O、pH7.0に調整)、0.27mlメルカプトエタノール、1.67ml X-gal 溶液 (20mg/ml X-gal in DMFA)) を浸した濾紙の上に置き、30℃で1時間以上静置した。この結果GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体は青くならなかった。すなわちGAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を活性化せず、2ハイブリッドスクリーニングシステムに使用可能であることが確認できた。

## 【0043】

## 2-3) 1次スクリーニング

GAL4-DNA-BDとXIAPとの融合蛋白質の発現が確認された酵母の形質転換体を大量培養し、酢酸リチウム法によりコンピテント化した。これを先に調製したHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Library で形質転換した。得られた形質転換体をSD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATのプレートにストリークし、7日間 30℃で培養した。これにより、baitとpreyが結合しGAL4プロモーターの下流にあるHis3遺伝子が発現しHis+になった酵母だけが生育しコロニーを生じる。用いたライブラリーのindependent clonesは $5 \times 10^6$ に対して実際にスクリーニングしたのは $72.5 \times 10^7$ であり約5倍量のスクリーニングが行えた。この1次スクリーニングでHis+になった酵母は82クローンであった。

## 【0044】

2-4) 2次スクリーニング;  $\beta$ -gal アッセイ

1次スクリーニングで得られたクローンにおいて、本当にbaitとpreyが結合しGAL4プロモーターの下流遺伝子を発現させているかを調べるために、もう1つのGAL4プロモーターの下流にあるlac Z遺伝子が発現しているかどうか、すなわち $\beta$ -gal活性をもつかどうかを調べた。SD/-Trp/-Leu/-His/+3-ATの寒天プレートにナイロントランスファーマンブレンをのせ、このメンブレン上に1次スクリーニング

でHis<sup>+</sup>になった酵母82クローンを培養生育させた。コロニーリフトフィルターアッセイによる $\beta$ -gal 活性測定により、His<sup>+</sup>かつ $\beta$ -gal活性を持つクローンを得た。この2次スクリーニングにより74個の $\beta$ -gal活性を有するコロニーを得た。

## 【0045】

## 2-5) prayの配列決定

クリーニングで得られたクローンに挿入されているDNA配列を調べるために、酵母からプラスミドDNAを回収し大腸菌に移した。

まずHis<sup>+</sup>で、かつ $\beta$ -gal活性を持つ酵母のクローンをプレートから掻き取り、SD/-Leu培地で一晚培養した。集菌後菌体を常法(Kaiser, P. & Auer, B. (1993) Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to E. coli. Bio Techniques 14 : 552)に従い処理し、酵母プラスミドDNAを回収した。

## 【0046】

HEPES-NaOHを用いてのコンピテント化されたエレクトロポレーション用の大腸菌HB101を、酵母から回収したプラスミドDNAでエレクトロトランスフォームした。エレクトロポレーション後、37℃に温めておいたSOC培地を加え、37℃で1時間震盪し回復培養を行なった。培養後、-Leuプレート(50 $\mu$ g/ml アンピシリン、40 $\mu$ g/ml プロリン、1mM 塩酸チアミン、-Leuドロップアウト溶液を含むM9プレート)にスプレッドし、37℃で一晩培養した。大腸菌HB101はleuB変異を持っており、酵母から得られたプラスミドDNAのうち、leuB変異を相補できるLEU2遺伝子をコードするライブラリーベクターのみが大腸菌HB101をトランスフォームし、プレート上にコロニーを形成することができる。生育した大腸菌HB101からのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法で抽出した。回収したプラスミドDNAを用い、大腸菌DH5 $\alpha$ をトランスフォームした。

## 【0047】

大腸菌DH5 $\alpha$ 内のpACT2ベクターのプラスミドDNAをアルカリ-SDS法により回収し、ポリエチレングリコール沈殿法により精製した。サンガー法に基づき蛍光シーケンサーによりベクター内の遺伝子の塩基配列を確認した。これにより、新規遺伝子X19を得た。

## 【0048】

## 2-6) 再トランスフォームによる確認

精製したpACT2-X19のプラスミドDNAで酵母Y190をトランスフォームした後、 $\beta$ -gal活性測定を行なうことにより、GAL4-AD蛋白質とX19との融合蛋白質単独ではGAL4プロモーターからの転写を起こさないことを確認した。また、pAS $\Delta$ NdeI(+2)-XIAPとpACT2-X19によってトランスフォームしたY190の $\beta$ -gal活性測定、およびpAS-X19とpACT-XIAPによってトランスフォームしたY190の $\beta$ -gal活性測定によりGAL4プロモーターからの転写が起こっていること、すなわちXIAPとX19が酵母核内で結合することを確認した。

【0049】

## 3. X19アミノ酸配列相同性検索

X19の機能をアミノ酸配列上から予測するために、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター及び京都大学化学研究所スーパーコンピューターラボラトリーのwwwサービス (<http://www.genome.ad.jp>) を用いて、アミノ酸配列相同性検索を行なった。

【0050】

### 3-1) 配列相同性検索プログラムBLAST

ノンリダンダントアミノ酸配列データベースnr-aaを用いてのX19のアミノ酸配列に相同な配列の検索を行なった (blastp search)。その結果X19はhuman thioredoxin reductase、human glutathione reductaseにそれぞれ55%、38%のホモロジーを有する新規遺伝子であった。更にhuman thioredoxin reductaseにおいて報告されている機能領域 (レドックス活性中心、FAD結合領域、NADPH結合領域、セレノシステイン活性中心) が完全に相同に保存されていた (図1、配列1)。よって我々はX19をヒト・チオレドキシンレダクターゼII (human thioredoxin reductase II; TxRII) と命名した。

【0051】

## 4. TxRIIの全長cDNAの獲得

### 4-1) コロニーハイブリダイゼーションによる全長cDNAの獲得

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、コロニーハイブリダイゼーションによりTxRIIの全長cDNAを獲得した。スクリーニングには、配列決定されたTxR



IIの部分配列からPCR法でDNA断片を増幅し、これをプローブとして用いた。

【0052】

i)コロニーハイブリダイゼーション用メンブレンの作製

Human Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryを希釈し、直径150mmのLB (ampicillin)プレート1枚当り $4 \times 10^4$ 個以上のコロニーが生育するようにまいた。これを12枚用意し、30℃で一晩培養した。ハイブリダイゼーション用メンブレンにコロニーを移し、常法に従いコロニーハイブリダイゼーション用メンブレンを作製した。

【0053】

ii)プローブの作製

TxRIIのcDNAを鋳型に下記のプライマーを用いPCRでN末端側約500bpのDNA断片を得た。

TxRII-sF3 5' - TAT GAT CTC CTG GTG GTC - 3'

TxRII-sR2 5' - GTC ATC ACT TGT GAT TCC - 3'

増幅されたDNA断片を1%アガロースゲル電気泳動で分離し、グラスマトリクス法により精製した。精製したDNA断片は、DNAランダムラベリングキット (amersham社製、rediprime DNA labelling system) と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  deoxy-CTP (ICN社製) で $^{32}\text{P}$ ラベルされたプローブを作製し、スピンカラム (pharmacia社製、ProbeQuant G-50 Micro Column) で精製した。

【0054】

iii)ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、ハイブリボトルおよびハイブリオープン (タイテック社製) を用いて行なった。DNAをクロスリンクさせたメンブレンは、ハイブリダイゼーションバッファー (10% PEG6000、1.5% SSPE、7% SDS) で65℃、1時間プレハイブリダイズした。 $^{32}\text{P}$ ラベルされたプローブを煮沸し急冷した後、65℃に温めたハイブリバッファーで希釈し、プレハイブリダイゼーションに用いた液と交換した。ハイブリダイゼーションは65℃で一晩行なった。

【0055】

iv)洗浄とオートラジオグラフィ

0.1×SSC、0.1% SDSの洗浄液でハイブリダイゼーションバッファーを洗い、適宜サーベイメーターで洗いの程度を確認した。洗浄液のカウントが無くなるまで数回洗浄液を換え、完全にカウントが無くなったら、メンブレンにフィルムをのせ、オートラジオグラフィーにより陽性コロニーを検出した。

【0056】

#### v) ポジティブコロニーの単離

パスツールピペットによりポジティブコロニーを単離し、これを希釈倍率を変えて直径100mmのLB (ampicillin)プレートにまき、30℃で一晩培養した。以下同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、単一ポジティブコロニーを得た。これよりプラスミドDNAを回収しそのDNA配列を決定した。こうして決定した塩基配列が配列番号：1に示すTxR11αのcDNAである。

【0057】

#### 4-2) PCRクローニングによる全長cDNAの獲得

2ハイブリッドで用いたHuman Placenta MATCHMAKER cDNA Libraryから、TxR11特異的なプライマーとライブラリーベクター特異的なプライマーを組み合わせ、PCR法によるTxR11遺伝子の獲得を試みた。用いたプライマーの配列は、コロニーハイブリダイゼーションによって得られたクローンの塩基配列に基づき、以下のよう設定した。

TxR11特異的プライマー1

5' - ACA GCT TCT GCC ATC TTC CTC -3'

TxR11特異的プライマー2

5' - AGA AGG TTC CAC GTA GTC CAC - 3'

ライブラリーベクター特異的なプライマー

5' - CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC - 3'

PCRは、TxR11特異的プライマー1とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、GeneAmp PCR System 2400 (PERKINELMER)を用い、下記のプログラムで行った。

a) 94℃ 5min.

b) 94℃ 30s、56℃ 30s.、72℃ 1min.30sを35サイクル

d) 72℃ 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製し次のPCRのテンプレートとした。2回目のPCRはTxR11特異的プライマー2とライブラリーベクター特異的なプライマーの組み合わせで、下記のプログラムで行った。

a) 94℃ 5min.

b) 94℃ 30s、56℃ 30s、72℃ 1min.30sを35サイクル

d) 72℃ 10min.

PCR産物を1%アガロースで電気泳動後、切り出して精製しTopo TA cloning Kit (Invitrogen)を用いてクローニングし、PCR産物のDNA配列をシーケンスした。その結果約180bpの5'-非アミノ酸翻訳領域を含むcDNAが得られ、最初のメチオニン(Met)の直前にKoZak consensusがある事などからこれが最初のMetであると断定した。しかしながらN末端側の配列は、酵母の2ハイブリッド法で得られたものと異なっていた。この遺伝子はTxR11の2つ目のエキソン以降は全く同一であることから、TxR11のオールターネイティブスプライシングフォームであると結論した。酵母の2ハイブリッド法で得られたものをTxR11 $\alpha$ 、オールターネイティブスプライシングフォームをTxR11 $\beta$ と呼ぶことにした。TxR11 $\beta$ はTxR11 $\alpha$ の2番目のエキソン以降は全く同一の遺伝子であった(配列番号: 3)。

【0058】

更にTxR11sのcDNA塩基配列に基づいて公知のゲノムの塩基配列を検索したところ、22q11.2にマッピングされることが確認された。TxR11sをコードする遺伝子は、いずれもこの領域の70kbpの中に18のエキソンに分かれて存在していた。この領域にXIAPとの結合活性や、あるいはTxR活性を持ったタンパク質をコードする遺伝子の存在は、まったく予想されていない。

【0059】

## 5. 抗TxR11抗体の作製

ヒトTxR11蛋白質に対する抗体を作製するために、免疫原としてGST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) 蛋白質との融合蛋白質を精製し、マウスに免疫することで、抗TxR11マウス抗血清を回収した。

【0060】

5-1) GST-TxRII $\alpha$  融合蛋白質の発現

pACT2-TxRII $\alpha$  からTxRII $\alpha$  フラグメントを pGEX ベクター (pharmacia社製) にリクローニングし、pGEX-TxRII $\alpha$  を構築した。このpGEX-TxRII $\alpha$  でトランスフォームされている大腸菌 (DH5 $\alpha$ ) をLB-アンピシリン培地で37℃で一晩培養した。その培養液を新しいLB-アンピシリン培地に100倍希釈になるように加え 37℃で培養した。培養液の濁度が 0.6 付近となったところでGST-TxRII $\alpha$  融合蛋白質を発現誘導するために IPTG (isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.5mM になるように添加し、さらに4 時間37℃で培養した。培養後遠心により集菌した。

## 【0061】

回収した菌体を氷冷した1% Tween- 20を含むPBSによく懸濁し、超音波破壊により菌体を完全に破碎した。破碎液を遠心し上清を、GSH-セファロース4Bカラム (pharmacia社製) に通してGST融合タンパク質をカラム吸着させた。カラムをWE buffer (10mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、2mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-HCl (pH7.5)) で十分に洗浄した後、G buffer (10mM GSH, 50mM Tris-HCl, pH9.6) を用いてGST-TxRII $\alpha$  融合蛋白質を溶出した。溶出液を50% glycerol / PBSで濃縮およびバッファの置換を行なった。

## 【0062】

5-2) GST-TxRII $\alpha$  融合蛋白質のマウスへの免疫、採血、反応性の確認  
精製したGST-TxRII $\alpha$  融合蛋白質とフロイト完全アジュバンドをエマルジョン化し、ネズミの腹腔内に注射した。この操作を毎週5週間続けたのち採血し、抗TxRII抗体を含む血清を回収した。この抗血清を使ったウエスタンブロッティング法により、免疫原、哺乳動物細胞で過剰発現させたTxRII、および各種培養細胞で反応性を確認した。

## 【0063】

## 6. ウエスタンブロッティング法 (図2)

培養細胞より可溶性蛋白質を調製し、常法(M. M. Bradford, Anal. Biochem.72, 248,1976)に従いタンパク質濃度を測定し、1 レーン当たり40mg タンパク質 になるようにSDS-PAGEを行った。これを抗TxRII抗血清でイムノディテクションし

、各培養細胞株に内在するTxR $\text{II}$ 蛋白質の存在を確認した。この結果、各種培養細胞でTxR $\text{II}$ の発現が確認できた。なお図2において、70 kDa付近のバンドがTxR $\text{II}\alpha$ であり、55 kDa付近のバンドがTxR $\text{II}\beta$ である。またマウスやラットの培養細胞ではTxR $\text{II}\beta$ の発現が確認できなかった。試料とした培養細胞は次の11種である。

Raji	ヒトのパーキットリンパ腫由来の細胞株
Jurkat	ヒトのT cell 急性リンパ芽球性白血病由来の細胞株
HL60	ヒトの急性前骨髄性白血病由来の細胞株
U937	ヒトの組織球性リンパ腫由来の細胞株
ZR75-1	ヒトの上皮性乳癌由来の細胞株
HepG 2	ヒトの原発性肝芽細胞腫由来の細胞株
HeLa	ヒトの子宮頸癌由来の細胞株
A 431	ヒト外陰部の扁平上皮癌由来の細胞株
MRC-5	ヒト由来の正常線維芽細胞株
NIH/3T3	マウスの胎児由来の正常線維芽細胞株
Rat-1	ラットの胎児由来の正常線維芽細胞株

【0064】

#### 7. 組み換えTxR $\text{II}\alpha$ タンパク質の精製と活性測定

##### 7-1) ヒスチジン-タグ融合TxR $\text{II}\alpha$ タンパク質の調製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNAHisにTxR $\text{II}\alpha$ の3' UTRを含む遺伝子全長（配列番号：1）をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることによりN末端側にヒスチジン-タグが付加されたTxR $\text{II}\alpha$ タンパク質が細胞内で過剰発現される。常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、ヒスチジン-タグ融合タンパク質精製用キットを用いて目的のタンパク質を精製した。

【0065】

##### 7-2) フラグ-タグ融合TxR $\text{II}\alpha$ タンパク質の精製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpcDNAFlagにTxR $\text{II}\alpha$ の3' UTRを含む遺伝子全長

をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、セレノシステインがタンパク質に取り込まれ、TxRII $\alpha$ のC末端側にフラグタグが付加されたタンパク質のみ、anti-Flag 抗体親和性カラムで回収することが可能になる。

## 【0066】

常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液をanti-Flag 抗体親和性カラムに通し、Flagのペプチドを用いてフラグタグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質を回収した。

## 【0067】

7-3) MYC-タグ融合TxRII $\alpha$  タンパク質の精製

哺乳動物細胞発現ベクターであるpCMVmycにTxRII $\alpha$ の3' UTRを含む遺伝子全長をサブクローニングした。このプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクションすることにより、TxRII $\alpha$ のN末端側にMYC-タグが付加されたタンパク質が過剰発現される。常法に従いリポフェクション法により293T細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で細胞を回収し、細胞抽出液にanti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースを加え、4℃で2時間穏やかに攪拌した。遠心により、anti-MYC モノクローナル抗体を結合させたプロテインAセファロースに結合したMYC-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質を沈殿させ、上清を取り除き、NETN buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 150mM NaCl) で数回洗浄した。

## 【0068】

## 7-4) 活性測定

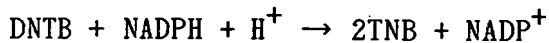
常法(Holmgren, A. and Bjornstedt, M.1995, [21] Thioredoxin and Thioredoxin Reductase Methods in Enzymol 252:199)にしたがって、DTNBアッセイ、およびインシュリンアッセイにより、TxRの活性を測定した。

## 【0069】

## i) DNTBアッセイ

DNTBアッセイは、次の反応式に基づいて、DTNBからTxR活性によって生じるTNBを

412nmのチオール吸収で測定する方法である。精製したタグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質 (1~50 $\mu$ l)をアッセイ用バッファー 1 に加え全量を1.0 mlとした。25℃で5分間、412nmの吸光度を測定した (図3)。



アッセイ用バッファー 1 :

100 mM potassium phosphate pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 0.2mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1% ethanol, 1 mM DTNB

【0070】

その結果、3通りの方法で精製したTxRII $\alpha$ は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとMyc-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り込まれていないTxRII $\alpha$ が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

【0071】

ii)インシュリンアッセイ

精製したタグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質 (1~50 $\mu$ l)をアッセイ用バッファー 2 に加え全量を1.0 mlとした。30℃で5分間、NADPHの酸化を340nmによる吸光度の減少によって測定した (図4)。TxR活性によってTrxが還元され、還元型Trxが更にインシュリンの還元を進める。このときに、酸化されるNADPHの量からTxR活性を測定することができる。酸化されたNADPHの量は以下の計算式で算出した。

$$\Delta A_{340} \times 0.5 / 6.2$$

アッセイ用バッファー 2 :

50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0, 20 mM EDTA, 80 mMインシュリン、0.25mM NADPH, 16 mM大腸菌Trx-S2

【0072】

この結果、3通りの方法で精製したTxRII $\alpha$ は、全てコントロールに用いた大腸菌由来のTxRと同等の活性を有することが判明した。ヒスチジンとミック-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質の活性が若干低いのはC末端側にセレノシステインが取り

込まれていないTxRII $\alpha$ が混入しているため、反応を阻害しているものと考えられる。

#### 【0073】

##### 7-5) 阻害剤アッセイ

組み換え体として得られた本発明によるTxRIIsの酵素活性と、天然のTxRの活性とを比較するために、阻害剤がどのような影響を及ぼすか観察した。TxR活性の阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。またTxR活性の確認には、DNTBアッセイを利用した。

#### 【0074】

阻害剤の希釈系列を0.2 mlのHEバッファー(100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA)で調製し0.2 ml分注した。3 mMのタグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質を調製して0.2mL加え、続いて3 mM NADPHと30 mM DTNBを含むHEバッファー0.2 mlを加えた。この溶液の反応系は100 mM HEPES buffer pH 7.2, 5 mM EDTA、1 mMのflag-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質、1 mM NADPHと10 mM DTNBになる。25℃で5 分間、還元されたインシュリンの量を412 nmのチオール吸収で測定した。結果は図5に示す。

#### 【0075】

この結果、精製されたフラグ-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質はこれまでにTxRIの文献で報告されているように、CDNB と13-シス-レチノイン酸によって効果的にその活性が阻害されることが明らかになった。本発明によるTxRII $\alpha$ は、公知のTxRと同様の機作により酵素活性を発現しているものと推測された。

#### 【0076】

##### 【発明の効果】

高等動物のTxRについては1990年代に酵素としてはじめて精製され、アミノ酸配列が報告されたのは1995年になってからである。高等動物のTxRは、タンパク質の大きさや基質特異性において、それまでに報告されていた下等動物のホモログと相違していたため注目されていた。しかし、ヒトにおけるTxRIIsの存在については予測すらされておらず、本発明によって明らかにされたTxRIIsの構造と活性には大きな意義がある。以下に本発明の意義を具体的に述べる。



## 【0077】

本発明は、抗がん剤のスクリーニングにおいて重要な情報を与える。TxRが抗がん剤のターゲットとして注目されていることは既に述べた。そのターゲットに複数種の分子が存在したことを明らかにした点において、本発明の意義は大きい。すなわち、より確実な治療効果をもたらすためには、本発明によるTxRIIsを含めたTxR活性を総合的に制御するためのアプローチが求められる。このような取り組みは本発明の知見によってはじめて可能となる。

## 【0078】

本発明によって提供されるcDNAには、TxRIIsのC末端付近に存在するセレノシステインの翻訳に必要なステムループ構造を構成する3' UTRが存在する。この塩基配列がTxR活性の発現に必須とされているセレノシステインを含む領域の発現を支えている。本発明において明らかにした3' UTRはわずか130bpで構成され、このような短い配列によってセレノシステインの翻訳が可能になることは新規な知見である。

## 【0079】

更にXIAP結合性タンパク質を単離したという側面から本発明を見れば、本発明によるタンパク質はアポトーシスの抑制をつかさどっているXIAPに結合し、その機能を制御しうる可能性を持っている。このような可能性を通じて、本発明はアポトーシスの促進のための新たな技術を提供する。アポトーシスの促進は、がんやウイルス感染細胞のような異常細胞の死を誘導することによって疾患の治療につながる。

## 【0080】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories Co.,Ltd.

<120> Thioredoxin reductase II

<130> M3-007

<140>

<141>

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1959

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(1572)

<220>

<221> misc\_structure

<222> (1567)..(1569)

<220>

<221> misc\_structure

<222> (1664)..(1666)

<223> tga is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 1

atggcggca atg gcg gtg gcg ctg cgg gga tta gga ggg cgc ttc cgg tgg 51

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp

1

5

10

cgg acg cag gcc gtg gcg ggc ggg gtg cgg ggc gcg gcg cgg ggc gca 99

Arg Thr Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala

15

20

25

30

gca gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg gtc ggc ggg gga tct 147

Ala Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Gly Ser

35

40

45

ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag ctg gga agg aag gtg 195

Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val

50

55

60

gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa ggc acc cgg tgg ggc 243

Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly

65

70

75

ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc ccc aag aag ctg atg 291

Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met

80

85

90

cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa gat gcc ccc aac tat 339

His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr

95

100

105

110

ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac tgg agg aag atg gca 387

Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala

115	120	125	
gaa gct gtt caa aat cac gtg aaa tcc ttg aac tgg ggc cac cgt gtc			435
Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val			
130	135	140	
cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac atc aaa gcc agc ttt			483
Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe			
145	150	155	
gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa ggt ggg aaa gag att			531
Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile			
160	165	170	
ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act gga ggg cgg ccg aga			579
Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg			
175	180	185	190
tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat gga atc aca agt gat			627
Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp			
195	200	205	
gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa acg ttg gtg gtc ggg			675
Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly			
210	215	220	
gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc ctc acc ggg att ggg			723
Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly			
225	230	235	

ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc ctc cgc ggc ttc gac 771

Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp

240

245

250

cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg gca tct cat ggc acc 819

Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr

255

260

265

270

cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tcg cgg gtc agg agg ctc cct gat 867

Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp

275

280

285

ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc acc ggc aag gag gac 915

Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp

290

295

300

acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata ggt cga gtc cca gac 963

Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp

305

310

315

acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta gat act agc ccc gac 1011

Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp

320

325

330

act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc acc tct gtg ccc cac 1059

Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His

335

340

345

350

atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg cct gag ctg aca ccc 1107

Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro

355

360

365

aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag cgg ctc ttc ggc ggg 1155

Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly

370

375

380

tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc acg acc gtc ttc acc 1203

Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr

385

390

395

cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag gag gag gca gtg gct 1251

Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala

400

405

410

cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac gcc cat tat aaa cca 1299

Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro

415

420

425

430

ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc cag tgt tat gta aag 1347

Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys

435

440

445

atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg ctg ggc ctg cat ttc 1395

Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe

450

455

460

ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga ttt gct ctg ggg atc 1443

Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile

465

470

475

aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg acc gtg ggt atc cat 1491

Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His

480

485

490

ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc atc tcc aag cgc tca 1539

Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser

495

500

505

510

ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg taagcgccat ccctgcaggc 1592

Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

515

520

cagggcacac ggtgcgcccg ccgccagctc ctgcgaggcc agaccagga tggctgcagg 1652

ccaggtttgg ggggcctcaa cctctcctg gagcgctgt gagatggta gcgtggagcg 1712

caagtgcctg acgggtggcc cgtgtgcccc acagggatgg ctgaggggac tgtccacctc 1772

acccctgcac ctctcagcct ttgccgccgg gcaccccccc caggctcctg gtgccgatg 1832

atgacgacct ggggtgaaac ctaccctgtg ggcacccatg tccgagcccc ctggcatttc 1892

tgcaatgcaa ataaagaggg tactttttct gaagtgtgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1952

aaaaaaa

1959

<210> 2

<211> 521

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Xaa(520) means selenosysteine.

<400> 2

Met Ala Val Ala Leu Arg Gly Leu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Arg Thr

1

5

10

15

Gln Ala Val Ala Gly Gly Val Arg Gly Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala

20

25

30

Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly

35

40

45

Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly Arg Lys Val Ala Val

50

55

60

Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly

65

70

75

80

Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys Lys Leu Met His Gln

85

90

95

Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp

100

105

110



Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala  
115 120 125

Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly His Arg Val Gln Leu  
130 135 140

Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp  
145 150 155 160

Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu  
165 170 175

Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro  
180 185 190

Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile  
195 200 205

Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu Val Val Gly Ala Ser  
210 215 220

Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp  
225 230 235 240

Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln  
245 250 255

Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser His Gly Thr Arg Phe  
260 265 270

Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln  
275 280 285

Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly  
290 295 300

Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg  
305 310 315 320

Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln  
325 330 335

Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser Val Pro His Ile Tyr  
340 345 350

Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala  
355 360 365

Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser  
370 375 380

Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu  
385 390 395 400

Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu Ala Val Ala Arg His  
405 410 415

Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu

420

425

430

Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys Tyr Val Lys Met Val

435

440

445

Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly Leu His Phe Leu Gly

450

455

460

Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys

465

470

475

480

Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val Gly Ile His Pro Thr

485

490

495

Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu

500

505

510

Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

515

520

<210> 3

<211> 2056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (188)..(1669)

<223> tga(1664)..(1666) is transrated to selenosysteine, shown by Xaa.

<400> 3

gtcccggacc tcaggcccag ttcagtgtac ttcccctctc tacttctctcc ctccagtccc 60

ttctccatcc ctcccttttt ttgctgcccc ttgcctgcct tcctcgccag tagcttgcag 120

agtagacacg atgacacctt ttgcaggcta aaaaggctga gagtggcact atgtgcagtg 180

agccacc atg gag gac caa gca ggt cag cgg gac tat gat ctc ctg gtg 229

Met Glu Asp Gln Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val

1

5

10

gtc ggc ggg gga tct ggt ggc ctg gct tgt gcc aag gag gcc gcc cag 277

Val Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln

15

20

25

30

ctg gga agg aag gtg gcc gtg gtg gac tac gtg gaa cct tct ccc caa 325

Leu Gly Arg Lys Val Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln

35

40

45

ggc acc cgg tgg ggc ctc ggc ggc acc tgc gtc aac gtg ggc tgc atc 373

Gly Thr Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile

50

55

60

ccc aag aag ctg atg cac cag gcg gca ctg ctg gga ggc ctg atc caa 421

Pro Lys Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln

65

70

75

gat gcc ccc aac tat ggc tgg gag gtg gcc cag ccc gtg ccg cat gac 469  
Asp Ala Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp

80

85

90

tgg agg aag atg gca gaa gct gtt caa aat cac gtg aaa tcc ttg aac 517  
Trp Arg Lys Met Ala Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn

95

100

105

110

tgg ggc cac cgt gtc cag ctt cag gac aga aaa gtc aag tac ttt aac 565  
Trp Gly His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn

115

120

125

atc aaa gcc agc ttt gtt gac gag cac acg gtt tgc ggc gtt gcc aaa 613  
Ile Lys Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys

130

135

140

ggt ggg aaa gag att ctg ctg tca gcc gat cac atc atc att gct act 661  
Gly Gly Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr

145

150

155

gga ggg cgg ccg aga tac ccc acg cac atc gaa ggt gcc ttg gaa tat 709  
Gly Gly Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr

160

165

170

gga atc aca agt gat gac atc ttc tgg ctg aag gaa tcc cct gga aaa 757  
Gly Ile Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys

175

180

185

190

acg ttg gtg gtc ggg gcc agc tat gtg gcc ctg gag tgt gct ggc ttc 805

Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe  
195 200 205

ctc acc ggg att ggg ctg gac acc acc atc atg atg cgc agc atc ccc 853  
Leu Thr Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro  
210 215 220

ctc cgc ggc ttc gac cag caa atg tcc tcc atg gtc ata gag cac atg 901  
Leu Arg Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met  
225 230 235

gca tct cat ggc acc cgg ttc ctg agg ggc tgt gcc ccc tcg cgg gtc 949  
Ala Ser His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val  
240 245 250

agg agg ctc cct gat ggc cag ctg cag gtc acc tgg gag gac agc acc 997  
Arg Arg Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr  
255 260 265 270

acc ggc aag gag gac acg ggc acc ttt gac acc gtc ctg tgg gcc ata 1045  
Thr Gly Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile  
275 280 285

ggt cga gtc cca gac acc aga agt ctg aat ttg gag aag gct ggg gta 1093  
Gly Arg Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val  
290 295 300

gat act agc ccc gac act cag aag atc ctg gtg gac tcc cgg gaa gcc 1141  
Asp Thr Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala

305	310	315	
acc tct gtg ccc cac atc tac gcc att ggt gac gtg gtg gag ggg cgg			1189
Thr Ser Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg			
320	325	330	
cct gag ctg aca ccc aca gcg atc atg gcc ggg agg ctc ctg gtg cag			1237
Pro Glu Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln			
335	340	345	350
cgg ctc ttc ggc ggg tcc tca gat ctg atg gac tac gac aat gtt ccc			1285
Arg Leu Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro			
355	360	365	
acg acc gtc ttc acc cca ctg gag tat ggc tgt gtg ggg ctg tcc gag			1333
Thr Thr Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu			
370	375	380	
gag gag gca gtg gct cgc cac ggg cag gag cat gtt gag gtc tat cac			1381
Glu Glu Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His			
385	390	395	
gcc cat tat aaa cca ctg gag ttc acg gtg gct gga cga gat gca tcc			1429
Ala His Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser			
400	405	410	
cag tgt tat gta aag atg gtg tgc ctg agg gag ccc cca cag ctg gtg			1477
Gln Cys Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val			
415	420	425	430

ctg ggc ctg cat ttc ctt ggc ccc aac gca ggc gaa gtt act caa gga 1525  
Leu Gly Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly

435

440

445

ttt gct ctg ggg atc aag tgt ggg gct tcc tat gcg cag gtg atg cgg 1573  
Phe Ala Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg

450

455

460

acc gtg ggt atc cat ccc aca tgc tct gag gag gta gtc aag ctg cgc 1621  
Thr Val Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg

465

470

475

atc tcc aag cgc tca ggc ctg gac ccc acg gtg aca ggc tgc tga ggg 1669  
Ile Ser Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly

480

485

490

taagcgccat ccctgcaggc cagggcacac ggtgcgcccg ccgccagctc ctgcggaggcc 1729

agaccagga tggctgcagg ccaggtttgg ggggcctcaa ccctctcctg gagcgcctgt 1789

gagatggtca gcgtggagcg caagtgcctg acgggtggcc cgtgtgcccc acagggatgg 1849

ctcaggggac tgtccacctc acccctgcac ctttcagcct ttgccgccgg gcaccccccc 1909

caggctcctg gtgccgatg atgacgacct ggggtgaaac ctaccctgtg ggcacccatg 1969

tccgagcccc ctggcatttc tgcaatgcaa ataaagaggg tactttttct gaagtgtgta 2029



aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

2056

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 492

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Xaa(493) means selenosysteine.

&lt;400&gt; 4

Met Glu Asp Gln Ala Gly Gln Arg Asp Tyr Asp Leu Leu Val Val Gly

1

5

10

15

Gly Gly Ser Gly Gly Leu Ala Cys Ala Lys Glu Ala Ala Gln Leu Gly

20

25

30

Arg Lys Val Ala Val Val Asp Tyr Val Glu Pro Ser Pro Gln Gly Thr

35

40

45

Arg Trp Gly Leu Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys Ile Pro Lys

50

55

60

Lys Leu Met His Gln Ala Ala Leu Leu Gly Gly Leu Ile Gln Asp Ala

65

70

75

80

Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Val Ala Gln Pro Val Pro His Asp Trp Arg

85

90

95

Lys Met Ala Glu Ala Val Gln Asn His Val Lys Ser Leu Asn Trp Gly

100	105	110
His Arg Val Gln Leu Gln Asp Arg Lys Val Lys Tyr Phe Asn Ile Lys		
115	120	125
Ala Ser Phe Val Asp Glu His Thr Val Cys Gly Val Ala Lys Gly Gly		
130	135	140
Lys Glu Ile Leu Leu Ser Ala Asp His Ile Ile Ile Ala Thr Gly Gly		
145	150	155
Arg Pro Arg Tyr Pro Thr His Ile Glu Gly Ala Leu Glu Tyr Gly Ile		
	165	170
Thr Ser Asp Asp Ile Phe Trp Leu Lys Glu Ser Pro Gly Lys Thr Leu		
	180	185
Val Val Gly Ala Ser Tyr Val Ala Leu Glu Cys Ala Gly Phe Leu Thr		
195	200	205
Gly Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu Arg		
210	215	220
Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val Ile Glu His Met Ala Ser		
225	230	235
His Gly Thr Arg Phe Leu Arg Gly Cys Ala Pro Ser Arg Val Arg Arg		
	245	250
		255

Leu Pro Asp Gly Gln Leu Gln Val Thr Trp Glu Asp Ser Thr Thr Gly  
260 265 270

Lys Glu Asp Thr Gly Thr Phe Asp Thr Val Leu Trp Ala Ile Gly Arg  
275 280 285

Val Pro Asp Thr Arg Ser Leu Asn Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp Thr  
290 295 300

Ser Pro Asp Thr Gln Lys Ile Leu Val Asp Ser Arg Glu Ala Thr Ser  
305 310 315 320

Val Pro His Ile Tyr Ala Ile Gly Asp Val Val Glu Gly Arg Pro Glu  
325 330 335

Leu Thr Pro Thr Ala Ile Met Ala Gly Arg Leu Leu Val Gln Arg Leu  
340 345 350

Phe Gly Gly Ser Ser Asp Leu Met Asp Tyr Asp Asn Val Pro Thr Thr  
355 360 365

Val Phe Thr Pro Leu Glu Tyr Gly Cys Val Gly Leu Ser Glu Glu Glu  
370 375 380

Ala Val Ala Arg His Gly Gln Glu His Val Glu Val Tyr His Ala His  
385 390 395 400

Tyr Lys Pro Leu Glu Phe Thr Val Ala Gly Arg Asp Ala Ser Gln Cys  
405 410 415

Tyr Val Lys Met Val Cys Leu Arg Glu Pro Pro Gln Leu Val Leu Gly  
420 425 430

Leu His Phe Leu Gly Pro Asn Ala Gly Glu Val Thr Gln Gly Phe Ala  
435 440 445

Leu Gly Ile Lys Cys Gly Ala Ser Tyr Ala Gln Val Met Arg Thr Val  
450 455 460

Gly Ile His Pro Thr Cys Ser Glu Glu Val Val Lys Leu Arg Ile Ser  
465 470 475 480

Lys Arg Ser Gly Leu Asp Pro Thr Val Thr Gly Cys Xaa Gly  
485 490

<210> 5

<211> 130

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

tcagcctttg ccgccgggca cccccccag gctcctgggtg ccggatgatg acgacctggg 60

tggaaccta ccctgtgggc acccatgtcc gagccccctg gcatttctgc aatgcaaata 120

aagagggtac

130

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

● <400> 6

gcgggatcca tgacttttaa cagttttgaa gg

32

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 7

gcgctcgagc tactatagag ttagattaag ac

32

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 8

tatgatctcc tggtaggc

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 9

gtcatcactt gtgattcc

18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 10

acagcttctg ccatcttcct c

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 11

agaaggttcc acgtagtcca c

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesis

<400> 12

ccatagatg ttccagatta c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 13

acgatggcgg caatggcgg t

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 14

accatggagg accaagcagg t

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis



<400> 15

ttaccctcag cagcctgtca c

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 16

gcgccatccc tgcaggccag g

21

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesis

<400> 17

cacacttcag aaaaagtacc c

21

<210> 18

<211> 103

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggcggcaa tggcgggtggc gctgcgggga ttaggagggc gcttccggtg gcggacgcag 60

gccgtggcgg gcgggggtgcg gggcgcggcg cggggcgcag cag 103

<210> 19

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gtcccgacc tcaggcccag ttcagtgtac ttccctctc tacttctcc ctccagtccc 60

ttctccatcc ctcccttttt tggctgcccc ttgctgcct tcctcgccag tagcttgcag 120

agtagacacg atgacacctt ttgcaggcta aaaaggctga gagtggcact atgtgcagtg 180

agccaccatg gaggaccaag 200

<210> 20

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

caggtcagcg ggactatgat ctccctgggtg tcggcggggg atctgggtggc ctggcttgtg 60

ccaaggagg

69

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ccgcccagct gggaaggaag gtggtggtgg tggactacgt ggaaccttct cccaag 57

<210> 22

<211> 145

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gcacccggtg gggcctcggc ggcacctgcg tcaacgtggg ctgcatcccc aagaagctga 60

tgcaccaggc ggcactgctg ggaggcctga tccaagatgc cccaactat ggctgggagg 120

tggcccagcc cgtgccgcat gactg

145

<210> 23

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

gaggaagatg gcagaagctg ttcaaaatca cgtgaaatcc ttgaactggg gccaccgtgt 60

ccagcttcag gacag

75

<210> 24

<211> 79

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aaaagtcaag tactttaaca tcaaagccag ctttgttgac gagcacacgg ttgcggcgt 60

tgccaaaggt gggaaagag

79

<210> 25

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

attctgctgt cagccgatca catcatcatt gctactggag ggcggccgag ataccccacg 60

cac

63

<210> 26

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atcgaagggtg ccttggaata tggaatcaca agtgatgaca tcttctggct gaaggaatcc 60

ccttgaaaaa c

71

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gttggtggtc ggggccagct

20

<210> 28

<211> 92

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

atgtggccct ggagtgtgct ggcttcctca ccgggattgg gctggacacc accatcatga 60

tgcgcagcatt cccctccgc ggcttcgacc ag

92

<210> 29

<211> 175

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

caaatgtcct ccatgggtcat agagcacatg gcatctcatg gcacccggtt cctgaggggc 60

tgtgccccct cgcgggtcag gaggtccct gatggccagc tgcaggtcac ctgggaggac 120

agcaccaccg gcaaggagga cacgggcacc ttgacaccg tcctgtgggc catag 175

<210> 30

<211> 137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gtcagatccc agacaccaga agtctgaatt tggagaaggc tgggtagat actagccccg 60

acactcagaa gatcctgggtg gactcccggg aagccacctc tgtgccccac atctacgcca 120

ttggtgacgt ggtggag

137

<210> 31

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ggcgccctg agctgacacc cacagcgatc atggccggga ggctcctggt gcagcggctc 60

ttcgccgggt cctcagatct gatggactac gacaat

96

<210> 32

<211> 93

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

gttcccacga ccgtcttcac ccactggag tatggctgtg tggggctgtc cgaggaggag 60

gcagtggctc gccacgggca ggagcatgtt gag

93

<210> 33

<211> 72

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

gtctatcacg cccattataa accactggag ttcacggtgg ctggacgaga tgcattcccag 60

tgttatgtaa ag

72

<210> 34

<211> 98

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

atggtgtgcc tgaggagacc cccacagctg gtgctgggcc tgcatttcct tggccccaac 60

gcaggcgaag ttactcaagg atttgctctg gggatcaa

98

<210> 35

<211> 195

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gtgtggggct tcctatgcgc aggtgatgcg gaccgtgggt atccatccca catgctctga 60

ggaggtagtc aagctgcgca tctccaagcg ctacaggcctg gacccacagg tgacaggctg 120



ctgagggttaa gcgccatccc tgcaggccag ggcacacggt gcgcccgccg ccagctcctc 180

ggaggccaga cccag 195

<210> 36

<211> 290

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gatggctgca ggccaggttt ggggggcctc aaccctctcc tggagcgcct gtgagatggt 60

cagcgtggag cgcaagtgct ggacgggtgg cccgtgtgcc ccacagggat ggctcagggg 120

actgtccacc tcacccctgc acctttcagc ctttgccgcc gggcaccccc ccaggtctcc 180

tggtgccgga tgatgacgac ctgggtggaa acctaccctg tgggcaccca tgtccgagcc 240

ccctggcatt tctgcaatgc aaataaagag ggtacttttt ctgaagtgtg 290

<210> 37

<211> 66566

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

atggcggcaa tggcgggtggc gctgcgggga ttaggagggc gcttccggtg gcggacgcag 60

gccgtggcgg gcggggtgcg gggcgcggcg cggggcgag caggtaggat ggggtcgggg 120

cgtccccgcg gtaggtgtcc gcgcggccgg ggtgtcctcg tgagggtgtc cgcgcggcgg 180

tggccagggt gtccccgtgg gggtgccac gcgggggtgt ccacataccg gcctcttggt 240

ctagtcttgc tcaggagtcc gggctgcttc tagccacaag tagccccctt cccagggtggg 300

gaaactgggg ctgggtgcct tgtctaagggt cctgctgtgc tgactgcacc tgtggtctcc 360

cagagctggt atcccagtaa caactacagt tctgaagatg atgatatccc acctcccag 420

gtcaccaggc accggcccca ctggccagac ttcccaactt ctcccagac ccctagactc 480

tagaggttag aggctgcaca gagcaatggg aggatacaca ctctctctcc tggagcccct 540

gaagaacagt taactaaatc aggacaataa tcataactga gcactcgaag cagaggctgg 600

gtgtctggtc actcaggaca gtccaagcct catcctgtag gacagactcc cctagatccg 660

accagagcgc caccatatct gttatgtgtg gccagtttca ttccatgcac gacaacatgg 720

tccccacca tgcagggggc ccctcgaccc agccccctgg atgcttgtga cagcgagcag 780

ctctccccac aggcagtgag ttagagggg tgtaaggacg gggtcagggc tccttcccag 840

ggatggcggc tatgggaggc atggtggctg gccctctgcc cgcggtggac tcgggagggg 900

gggctgactg tgtgtgtgaa tgggcagagt tggctgctatg gaggttttgg gggctctccag 960  
 gacggagggt ggccaacag agttctggga ggcagtcacc acctcgtggc cttgctgaga 1020  
 cctggaaccc tcagccaggg cactccatct ttcaaagctt cttggctgca tgcgtcaggt 1080  
 gggcaagctc aggaaggtaaat aatgcacccg tgctggcgga gtcccataaa aggggattcg 1140  
 gcatcaaaag gaggaaaaag gticaaaggg catttatcat ggggttcaga atcacggatg 1200  
 tgaggggcgg tagtggggac aacagacaga aaagcttccc ctcccatac tcacagtcca 1260  
 gacacggcaa tagccaaatt ccaaatttct aggtattctg gactcagaat ggggaatatc 1320  
 atacgagact tagggggata atgcccttat cticctatit taagggaag acaaaactga 1380  
 accttctatg caaaatagga tgatgaccc ggtccctcca gtaagaaata aaataagtag 1440  
 tctccaggca ttcctttccg ccagaggagc aactgttttt taaatagccc tttcgtgccc 1500  
 agtctgttac taaaccatat gagttgtttt ttgggggttt tttttttttt tttttttttg 1560  
 agacagtgtc ttgctctgtc gcccaagctg gactacagtg gtgcgatctc agctcactgc 1620  
 aagctccgcc tcccgggttc acgccattct cctgcctcag cctcccagat agctgggact 1680  
 acaggcatct gccaccacgc ctggctaatt ttttttgtat ttttagtaga gacgggattt 1740  
 cactgtatta gccaggatgg tctcaatctc ctgacctcat gatccacctg ccttggcctc 1800

ccaaagtgc	gggattacag	gcatgagcca	ctgcgccag	ccgagtcatt	ttttaatact	1860
actgcatgtg	agttaacaca	atcattccca	aattgaagtt	ttagatgggc	cctcaaaatt	1920
tttaggatat	ggttttccta	caggtttata	ttgaaagtat	ggggtatctc	ctattactcc	1980
tcitttttatt	tgtcttaaag	gagaaaggga	gaggccagag	accaaattgc	cccatttccc	2040
tatagctaatt	ctctctggaa	gacaagcagc	ccagacttga	gcttctagat	ggatacaacc	2100
aggtgcatgt	ccaaggcaca	gaggagggtta	tttataaccc	atagtaacat	taaatgcagt	2160
gccttctcct	ggctgagcgg	tgcaacggtc	atctgtagtt	ccaggcatcc	acacactatc	2220
gtagtatag	atttctgcag	gagcatccat	ccaggtgaga	ggcgaataa	gtggaggaaa	2280
aggcacataa	gccaataag	aataattttg	tgtagcaggt	aatcagttt	aaggggaaac	2340
tggtgagaca	gaaagtgtaa	ggaagataat	tattaaataa	aacctattgt	aagtgagatc	2400
cagtgtctgaa	ggaggaagag	aagaacagag	ggatgttatt	ttcaggctaa	tagaaatggt	2460
gagattttta	ggttcgtaag	gagaaaaaga	taattaggag	aagtgggatt	agtttagagg	2520
gittacattg	ccattaggga	ggattgaacc	agaccattt	tgatttgga	tgccagtttc	2580
tgaggagtcg	gtacagatct	catcaggtat	gagggcagtc	tctgacgcga	acgtctcttc	2640

ctcgtggttt ttattgtcag tattcacacg aagttaaagt ctcctagtgg gcacccagac	2700
gggattgacg atctcctggt aaaacacaag cataccctct tccccacgtt ataattgttc	2760
caggttccca ggtattgggt tgggagtttt tccatgacac tggcttgcct tcgtttaggg	2820
agaatTTTTT gcctgtataa tggcatttag ctgcagtcag agtattgttt ttaggaacat	2880
ttagaaagct taaacaatgc taaatataat tgggagtggg gagtagttaa attatgcttt	2940
taaaccagcc ttgtcttctt ttacagtaac ttgaagaggt ttagtaattt tttcacgttt	3000
tggaccgaga ccgagtctgg aaacaaaccc catgttttcc attatatgtt gactggggagc	3060
actgtaaaag ttatgtggaa tattaatttc agccccaatt tgtgccagca aatctctgcc	3120
ccgaagatta atggggatgg gcatgatata aggctgaatt gtccctttt gaccatcagg	3180
gccagtgcaa gccaagataa atgtgctctg gtgaacttct tcagcttttc taacaccttc	3240
tagtticatg ttagtgggat gtttaagcca ggaggaaggc cataaattag aggaaataat	3300
agaaacatca gccccagtat caactaggcc ctcaaccttt ttcccttgaa tgtgtatggt	3360
gcaggtaggc cattgttttag aaattacatt aatccaataa gcggcttttt caccgctgga	3420
gccccatcca gggcccatg tcttatctcc ttgttttaaa acaatgttag gtagtaaaag	3480
taattgagca attgactcac tggccggaat ggaaacagga actttggcag acaccataag	3540

tttacataag tttaatctca tcagaggaat cagaattaat gagactagta tgaactatga	3600
tacctttagt atcatgaggt ggatgccctg cctaacacca ggcccaccga accttgaggt	3660
aaagggccag tgacccccat ggggacaatt aaaggcaaag aattaggtag taaatttaga	3720
ggaatggtac tacagagatc gaccgccctg ctgcctactg tggaggtaga caagcattgt	3780
actgagacag aagaagaggc tgggacccat ctggattggc tgiaggtaaa tttttttgtg	3840
ctgggggctg cgttgggact gcttgacgca aaaacacaac attggtctga gtccgaggtg	3900
tcccatttga tattggggcc tgggactggc ctgtcttcct gtttccctgg ttctgtggca	3960
agggattttc atctatatca gactgagtgg caagtacttg cccaatgttt acccttacga	4020
caacgcaggc aaacagtagc aggagcattt ggccgtgttt gttgagccgg cttggccgct	4080
tttaagtttt taacagtgtg gtttttttgg gtatgaccaa gttggccaca attatagcag	4140
gctccaagaa aagaatcagt cgagccagtt tggttgccgt gcttcatggc cggtgcccac	4200
agaatagctc tgtgggtctc cgatccaacg ccttcacaag cttaatatata tgcaggcaac	4260
acctcatgat caggtaaatt ttgacgtagg atggaatgca cggccatttt acactcatgg	4320
ttcgcatttt gaaaagctaa catatgaaga agaatacctt gagtgtgctc atcagagaca	4380

gatttttcaa cagcatcttg taatttagct aaaaaatcaa gatataattc atttgigaccc 4440

tgtttaacaa tagtaaaaga aacagaagct tggcctgggg tgcgtaattt atcccaagct 4500

ctcatacaca cctttgttac ttgttccgtg gtgagagcat caaagcctaa atgagcagta 4560

gtatcagagt aattatcgga gcctgtgagc tgagcctgag taattggaat gccatcagcc 4620

cgatttagct gagcctgcag gcgggcctcc tctgaccacc aggtatggaa ttgtaaatgc 4680

tgagatggag ttagaacagc ttttgccaaa aggtcgcagt ctataggaag caaaatgacc 4740

tcggtacaaa gagtctgtaa tacgttttaa cataatggaga agtaggaaca tactgagtag 4800

aagcatcctt gaattctttt aaaaaggtaa gattgagcgg cgtatatcga cacacttgta 4860

ccccitgagc attaggaggt tccagcatga ccgaataagc ccacgcctct aatctacttg 4920

tttgttttgg cgtaataagc attgcatgaa agtttcaaga gcaggcacat gagatagagt 4980

cggcatagaa gtgacaggaa aagtatgtat agataagaga aactgagatt gacggggtcg 5040

gactgggtata agagtgtgag aaaggggcat tgggggagca gaagaggcag aagcatactg 5100

gtgattactg gccagtcct gcacaaccag agtggcaggg gtgtccctgc atgaagaagg 5160

gtacagagaa gcaggttgag tggatggcaa agtgaccggt tgagggacca aaatgatagg 5220

agggtgaggg gctgtggtgg atgggggagg gcctgcagaa ttacaggtaa attgtagttt 5280

ggatggctcc ggaggcaaag actgtaaagg ttggagagg gaagagttag catagatatg 5340

gtcctgggct gtcigagttg gggccgcagg agctacaagt gtcggctctt cgtgaaaaga 5400

aataagatca tcagggggtg atgtaagcc aaagtcactg gagttagata ttgaatcctc 5460

agtatcgtca ggtgggggag gagtaggcaa agggaggggc tgagcagata atgaaggccg 5520

agtgggagag gaaagctgag gaagaggtag aggggtggcca gattcagaaa actgtggtaa 5580

ctgcagggtg tcacgggatt ggtatgtcat taggatggca cgtaccaagg cccaatcacc 5640

ccaaacagtg acaggaacat aatttcctgt tgggaccagt tctcggaatt ttgcaccaac 5700

atgatcccat agttccacat ctaacgttcc cttttcagga aaccaaggac agtgtttctc 5760

cactgccctg aatagggtga ccatattttc catgggaacc cgaactcccc cattttaaca 5820

ggaatttaat atagcagaga taagcataat gtttagactc tgcgtgaccc atagttaccc 5880

cggagaatac acagacaact caccaatcgt tggggagcca aacaagcatt tctgtggact 5940

ggaccgatga acatttctcc gcacctacca aagggaatcg ggttcccaca tgcacttagg 6000

aaaaagaaaa ccacgttggg cgccagatat tgggggaacc tgcccctaatt atttcaacgt 6060

acgttctttc tattttctgt aaggtcagc cggctgagaa atgaagagaa agagtacaaa 6120



gaggaatttt acagctgggc tgctgggggt gacatcacgt atcggtagga ccatgatgcc 6180

cacctgagcc gcaaaaccag caagtittta ttaaggattt taaaaggga ggggttgtgc 6240

caataggag taggtcaca agatcacatg ctcaaagg caaaaggcag agcaaagatc 6300

acatgcttct gaggaacag gacaaggga aaatcagaac tcctgataag ggtctatgtt 6360

cagctgtgca catattgtct tgataaacat cttaacaac ggaaaacatg gttaagagc 6420

agagaaccag tctgaccaca aatttaccag gacggagttt tttccccacc ctaataagcc 6480

tgagggtact gcaggagacc agggcgtatt tcagtcctta tctcaaccgc ataagacaga 6540

cactcccaga gtggccgttt acagacctcc cccaggaat gcattcctt tccagggtct 6600

taatagtaat attccttgct aggaaaagaa tttagcgata tctctcctac ttgcacgtcc 6660

atttataagc tctctgcaag aagaaaaata tggctctttt tgcctgaccc cacaggcagt 6720

cagaccttat ggttgtcttc gtccctaaa aatcactgtt attctgttct tttcaagg 6780

gcgctgattt catattgttc aaacacacgt ttacaatca atttctacag ttaacacaat 6840

tatcacagtg gtcctgaggt gatgtatatt atcagcttat gaagataaca ggattaagag 6900

ataaagacag gcataagaaa ttataaaagt attacttggg ggcccaggcg cgggtggctca 6960

tgccigtat cctagcactt tgagaggccg aggcagccat atcacaaggg gaggagatca 7020

agaccatcct ggctaacatg gtgaaaccct gtctctcctg aaagtacaaa aaattagcca	7080
gggtgtgggtg cgggtgcctg tagtcccagc tactcaggag gctgagacag gagaatgggtg	7140
tgaaccagg aggcgagct tgcagtgagc tgagattgtg ccactgcacc ccagcctggg	7200
cgacagagag agaatctgcc tcaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaagtataaa agtattactt	7260
gggaattgat aaatgttcat attgaaatga aatcttact atttatgttc ctctgccacg	7320
gctccagcca gtccctccat tcggggttcc tgacttcctg caacacaggt gtgagccact	7380
gtaccagac taggggtgca gttttttttt tttttttttt ctgagacaga gtctcactct	7440
gttaaccagg ctggagtgc gtgggtgctat catagctcac tgcagccttg aactcctggg	7500
ttcaactcac cctccagcct cagcctccct agtagctggg actgtgggcc ctgcagtttc	7560
tccttttaga gtaggaagac ctgaactgtc ccaggcttgg agtgggtggg cgatgcagcc	7620
cctgaacagg agccagaatg acaacacctg ctgccaggaa agagctctag atagagcagc	7680
catacaggag ggccccctgag gtggcaccct gaggtggcca gcctgcctgt ggggtcacat	7740
tttgggggac ccttccactt gccctcactg gtgcagtgtc gcattctctt gggccttgct	7800
atgagctctg ggctcctgct ctttgctggc ctgtaccagg cagtgggttc aaagaggagc	7860

agaaaattaa tggacaatat gtcagaaggc agaggcaaga cagacacttg ctggggccaa	7920
gccctgcagg tggagagggt atgcctggct aaagtgggtg aaaggcaagg ttatgaggtt	7980
ctccaggaca ctggagtgca caggigggtg gtccccaggt aacgcctgcc acccagccct	8040
tcctcccaca gaacagcatt tgcctaccc acctttgagg tactttgggg tccttccttc	8100
ccagcaggct acccaagccc ttccaagtgc ttaaaggcag atttcctatg cttgcaaacg	8160
actgccctat gccagtgttt atcagcccga gagggctcct ggggtgtcac agggggcgag	8220
caagctgccc aagataagca catcataca gacagctgct caccctgcct gatagcagac	8280
agagggggca cagtgcgagg ctgcagggca ggatgacctt acaaggggcc tgctatggca	8340
acaagaagga caggcacctg ccatggaagg tagggacgtt ctgagcaaag cttccggcta	8400
ccaggcagct ggaggagaga gatgcttctc catcagcagg ttcatgctcc ccgggggacc	8460
tggtggcatt ttctccctga ccagcagctc ttggttctct agacttatat taaagccatt	8520
agaataattt acaacaattt aggcctttcc agagcccttg agttgaatta ggaattgagt	8580
gtgctttgga ctggctgttg gaaccgagtt gtggctctgt cagttcccgc aggtgcgcac	8640
acatctcacg tgcactcaga ggctggctgc cagggtgaaag agtgggtggg tttggttgtg	8700
gggcaggctc gctgcaggcc atggcctgag tgccctggatg cagcttccca agctttctca	8760

gctgtgagcc agggctcctc taggctccag ctcttgatc ctttaggagt gcatgttcta 8820

gacctgtctg tggggcatct gcagggccag ggtgtggaga gacatgacac tccaagtaca 8880

ctctctgcag ccttgccctgc ctaggaaggt ggaggtggct gcaaagataa gtgcagcctt 8940

ctcatggcag acgctaggct ctgatggagg tgttgggcag gttgccagc cttgtatgac 9000

agaccctgct ctgatcatgg aacctcttgg ctttgtctga agcagcgacc ggctccagat 9060

gctctgggag ggtgggtgctt ctcatctggg caggctcgtg tctgcagagg ggctgagggc 9120

actacttggt ttatacccta gagtcttgtc atcagtcgcc accctgccct caccacagca 9180

gactgatgac ttgctattat ttcttccttc cttcagcagg gatttggctg gtgcctgggtg 9240

ctgggtgtcc cggacctcag gccaggttca gtgtacttcc cctctctact tcttcctcc 9300

agtccttctt ccatccctcc cttttttggc tgcccttgc ctgccttctt cgccagtagc 9360

ttgcagagta gacacgatga caccttttgc aggctaaaaa ggctgagagt ggcactatgt 9420

gcagtgagcc accatggagg accaaggtga ggcgacacca caaccagccc aaaaggaatt 9480

ccagggatga aacctgagcc caggcagctc tccctgtgcc cagggtggct tccctcctag 9540

ctgactgcag ctgggcacac caagaccctg gctgtgtgca ctggccagct gtgagggaca 9600

ggggctgctt gtgcttttat tctttttttt tttttttttt ttgagacgga gtctcactct 9660  
 gtctcccagg ctggagtgca gtggcgtggt atccgctcac tgcaagctcc gcctcccggg 9720  
 ttcacgccat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg actacaggcg cccaccacca 9780  
 tgcccggcta atttttttgt attttttagta gagacgggggt ttcactgtgt tagccaggat 9840  
 ggtctcgatc tcctaacctt gtgatccacc cgccttggcc tccaaaagtg ctgggattac 9900  
 aggcgtgagc taccgcccct agcctgtgct tttattcttg ctcacttgtg acggagggca 9960  
 gccttcacaa ctgaaaggca cgtggacttg agaattgttt agtccacctt ggtggctcat 10020  
 gcttgtaatt ctagcacctt gggaggccaa ggtggaagga ttgcttgagg ccaggtgttt 10080  
 gagaccagcc tgggcaacat agccagaccc catctctaca aaacaaaaaa atttagctgg 10140  
 acgtggtgat cggctgttgt agtcccagct attctggagg ctgaggctag aggatcactt 10200  
 gagcccaaga ggtagaggct gcagtgagct gtgattgtgc cactgtgccc ctgtcgtggg 10260  
 ggcccttccg ggtctatgtc ccagccctgt gctgaccgtg ttccttctca cctttcatcc 10320  
 ctccccaag cagggcagtg gactacaatc ttctgggtga cagagtgaga tcctgtctca 10380  
 aaaataaata gaataaaaaa gaaaatatct tagttctgtg tctggctgag aacactgggt 10440  
 gaggtttgag ttcagagtgg ttggtatggt gtgcgtgtga ttttgcaaag atgatcacac 10500

acgcccacgg ccaacctcac caccatatgg ctgggtctct ggatttgcac agactatgtg 10560

tatcgagtca ctctttctgc tctgttgtgt ggtgtcttgt caccctgac catcacagaa 10620

tggagtgtcc aatcctgata aaattgatcc tgtaccacgt ttaaccagac agacagtccg 10680

tcccacctct catcccttct ctacgcaggt cagcgggact atgatctcct ggtggtcggc 10740

gggggatctg gtggcctggc ttgtgccaag gagggatatgt attctgtata cttcgtggca 10800

aggcctcgaa gcttttaggg cccctagaga gggtggtgct gtccagaaaa cgtccatgag 10860

caaaatgcgt tgcctccctg ctgggggtcac cccagtggcc tctgtgttgt ggcttgttcc 10920

ctgccactct ccagctgtct gctgtaccca gcggccgccg tggcacttca tggctgaact 10980

gccttcctca gctccagccc tccagctctt ctgctttact cacagtgaca gcccgaatcc 11040

gactagtctc agctcccacc actcacaccc tccgtgggct cccactttc cttcacgtgc 11100

ttctggacag tcctctcctt caccctactg tggctgtcac cctgcctgcc tgctctctgc 11160

ccctgcccgg ctagctgcga ggctggagct gcaccctcct gcttgtccct gtccttgttc 11220

ttagtgctgg tgccttcccc cagggtccat ggtcagttct gctgggtgag tcttgtactt 11280

ggcctggcac ccattgagta aagatgttgg gcgaacgggc tggaccaga ggtgtccaga 11340

gatgacactt tgcagttctc tgctaacca cgtgatgcac aggccaccag cactttgcca 11400

gactctgtgc cctgctgtag gaggttcctgg tctgctctgg ccatgtctac acaatgataa 11460

gagggcagtt gtggtgaatg gggaggggaag gggatgagag ggaggtgggg ctgaaatgag 11520

agggagttaa ctgggcactt tggccctgaa gctgtgcttc tctgatgtcc agtattgggc 11580

tctagaagca tacatggtgt aaaagaaatc cactactctt gctctgtggg ggccggggag 11640

tgtgtaggaa cctgggaagt ctccctggcct attggggatc cgcagaggca cccaggatca 11700

gtgccacact gtactctcag aaccactccc agaaacgatg gcgcaggcag ccacgaggcc 11760

tagtgctgtt ctttttagca gaccgggcac ctgggctgtg cgttcactcc catgctggga 11820

gtgaccagct gcagagacct gagtccctt taatccggaa tgtggacagc tcctgggtat 11880

gtctccgcct ttcattgagag tggcatttcc ctgcagagga tgacgtggtt ttgtggcttt 11940

tttgagatga actgtaccta tcaaaatggg caacctgatc attcttatgt gtgcatgtgt 12000

ccatgcagcc agtaccgcag tcaagattgg cgagtgtgtc ctccaccccg ttagtctgcc 12060

agggctgccg taataaacag actgccataa cagactgggc ggctgaaaca acacatgctt 12120

attgtctctc agttctggag gctagaaatc atccagggtc gggcagggtt gatttcttct 12180

gaggcctctc cgttgggctg tagatggcag ttgtcgtccc tctgtgcatg tctatgtcct 12240

aatctctacc tgtacctgtc ctaatggatc aggtggatgc cctcttattt tgttggcttt 12300

ttattggaga cagggtcttg ttctgccicc caggctggag tgcagtggcg tgatctcagc 12360

tcactgcaac ctcaaactcc tgggttcaag ccatactcct gccttagcct cccaaaatgc 12420

tattacaagt gtggccactg tacctgtata tggcctaatt tttttttttt tttttttgag 12480

atggagtctc gctctgttgc ccaggctgga gtgcagtggg gtgatctcag ctactgcaa 12540

cctctgcctc ccgggttcac gccattctcc tgtctcagcc tcccagtag ctgggactac 12600

aggcgccac caccacgccc ggctaatttt tttatttttt agtagagacg gggtttcact 12660

gtgttaacca ggatggtctc aatctcctga cctcatgac caccacctc ggcctcccaa 12720

agtctggga ttacaggcgt gagccaccgc gcccggccta tggcctcatt ttaactaac 12780

taccttttt ttttttttgc aagcgagtct tgctttgtca cccaggctgg agtgcagtgg 12840

tgagatcttg gctcactgca acctgtgcct tctgggttca agcgattctc ctgccacagc 12900

ctcctgagta gctaggatta caggcgcctg ccaccacacc tggctaattt ttgtatttta 12960

gtagagacgg ggtttcacca tgtttgtcaa gctggtctcg aacttctggc ctcaagggat 13020

ccgcctgcct cggcctccca aagtictggg attacaggca tgagtcaccg tgtccagcca 13080



acttaattac ctttttgaag accctatctc taaatacagt cacattctga agtgctaggg 13140

tttagggcct ccacataggg attttgaggg gatatggctc agcccataac accccaacat 13200

tttctgaaac cttaggcagtt ccttccggct tccccactt ctgcatccta ggcaaccagg 13260

catgtgctgt ctgtcactat agtttgcatt ttctataatt gcgtataaac ggaatgctgc 13320

tgtatgtcat cttcctcttc tggcttcttt cactcagggt aatgacctg agactcatct 13380

tcgttggcgc gagtgtcgat ggtttcttgc ttttcattgc tgagtagtgt tctgtttatg 13440

gctgtgccgt ttcgtgtacg tgttccccig tagctggaca ctigaattgt ttccaccttt 13500

tggccattgt ggacagtatt gctgtgaacg tctgtctgtg tgtttgtgtg gatatatgtt 13560

ttaaattatt ttgggtaagt gcctaaaaat ggaccaactg gatcgtgtgg tatactctctt 13620

atttaggtat ttttcatctt ctttagcag cattttgtag ttctttttt actcaagttt 13680

ttttttttta ttaaaaaaaaa gaaagatgag ggtctctctg tgttgcccag gctggctctca 13740

aaatcctggg ctcaaatgat cctcccacct tggcctccca aaacgttggg attacaggaa 13800

tgagccacgg tgcctggcct gtggttttca atgtctacgt ctttcacata ttttatcaga 13860

tacatcccta agtgtttcat atttttagaa tagttttatt gagatatacc tcacattacg 13920

tatgcatttg tcccttggta cccgaggacg actgggttca ggaactcccg ctgttagcag 13980

aatccatgga cactgaaatt tgtgcatact ggagtcaggc agttggccct gaagcaccca 14040

cagatacaga gtcagccctc tgtatatata gttttgcatc ctatgaatac tgtttttttc 14100

tttttctttc ttttctttct ttctttcttt tctttttttt tttttttttt ttgagacaag 14160

gtctcatgtg ttgcccaggc tgcagtaaatt ggtgcaatct cggctcactg caacctccac 14220

ctcccgggtt caagcgattt tcccacctca gcctcccagag tggctgggac cacaggcgcc 14280

accatgcccc gctacttttt gtattttttt ggtggagaag gtgggtttcg ctatgttgcc 14340

caggctggtg ttgaattcct gagctcaagt gatccgtctg cctcagcctc ccaaagtgtc 14400

ggattacagg catgagccac catgtccagt ggagtactgt atttccaatc cgagtttggt 14460

tacagatttg gaacttgctg atatggagag ataatatata tatttttttg agaccgagtt 14520

tcgtctttgt caccaggtt ggagtgcaat ggcacaatct cagctcactg cactctccac 14580

ctcctggatt caagcagttc tcttgccctca gcctcccagag tagctgggat tacaggtgcc 14640

tgccaccacg cccagctaat ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca ccatgttggc 14700

caggctggtc tcgaactcct gacctcaggt gatccgccca ccttggcctt ccaaagtgtt 14760

gggattacag gtgggagcca ctgtccccgg tcaagggtt atatttattg aaaaaaaatc 14820

catgtatgag tggacctgtg cagttcaaac ctgtgttatt caagaacatt ttagttttctc 14880

cccaaaatac cctgtaccca ttggcagtca gtctcttccc ccctctcccc agccccctggc 14940

aaccactaat ctacttccta tatccgtgga tgtgtctgtt ctggacattt cagctgtttt 15000

ttggttggtt ggttgtttgt tticagacag ggtctgactc tgttgcccag gctgggggtgc 15060

agtggcacca tctcggctca ctgcaacctc ggctctcgg gctcaagcaa ttctcccacc 15120

tcagcctccc gagtagctgg gattacaggt gtgcaccacc acatccagct aattttttgt 15180

atttttagta gagacgggtt ttcaccatac tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc 15240

tcaagtgtc caccacatt ggctcccaa agggttggga ttaacagggt tgagccgccg 15300

ttgttttgtt ttttgagatg gagtctcgct ctgtcacctt gactggagtg cagtgggtgtg 15360

atcttggctc actgcaacct gtgcctctg ggctcaaagt attctcctgc ctcagcctcc 15420

caagtagctg ggaccacagg cacacaccac tatacccgac taatttttgt acttttagta 15480

gagatgggggt ttcacatgt tggccaggct ggtcttgaac tcttgacctc aggtgatccg 15540

cccacctcgg cctcccagag tgccggtatt acaggcatga gccaccgtgc ctggcctctt 15600

cgcatattct ttttcttttt ctttcttttt ttttttttt gagacggagt ttcgtcttg 15660

ttgcccaggc tggagtacca tggcacaatc ttggctcacc gaaacctctg cctcccaggt 15720

tcaagcaatt ctccctgcctc agccctcctga gtagctggga ttacaggcat gcaccaccac 15780

gcctggctaa ttttgtatit ttagtagaga aagggtttct ccatgttgag gctggctttg 15840

aactcctgac ctccagtgat ccacccgcct cggcctccca aagtgcctggg attacaggcg 15900

tgagccacca tgcccggccc tgcactttct tgatgggtatc ctttgtgcca caaaagtttt 15960

aaatttttgt gaagtcctaa tttatctatt ttttccctt gtgcttatg attttggtat 16020

catagctaag aaatccaaga tcacaaagat ttacacctgt gttttcttct aagcatttta 16080

tagttcaagc tcttacagtt aggtctttga tttattttga gtgcttttag ggtttatggc 16140

atgtacctta acttgccagt ctaccttaaa aaaagcatac atctattcca cccctcctaa 16200

cttcattct atgttattat atcatgtgt tactgttaca tgttataaat ccatgataca 16260

tcattattat tttgtttaa aatatactta aatcgtgtga gaaaatctca catactcacc 16320

cattgtatit ctgtgctctt cattccttg tgaggatcca catttccatc tggtatitit 16380

cttctacctt aagggcaccc tttagcattt ctgttaatat ggctctgggg gtaatgaatt 16440

ctctcagctt ttgtatgtct gaaaacgtct ttattttgcc ttcttttttg ttgttgtgt 16500

tttgttttgt tttgtttttt gagatggagt ctgtctctgt cgcccaggct ggagtgcagt 16560

ggtagatct cagctcactg caagctctgc ctcccgggtt tgcgccattc tccgcctca 16620  
 gccicctgag tagctgggac tacaggcgca tgccaccatg cccgtctaata tttttgtgat 16680  
 tttagtagaa acggggcttc gccgtgtag ccaggatggt ctgatctcc tgaccttggtg 16740  
 atccgcccc cttggcctcc caaagtgtg ggattacagg cgtgagccac catgcctggc 16800  
 cccccgcttt tttttttttt ttcagtactt taaaaatttt gccctctga cttctggctt 16860  
 gcattgtttc cagtggagaa tctgctacta tttttatctt agtgtctctg tagtgtgtct 16920  
 tggttgcttt taggattttc tcttttcatt ggccttgagt cctccttct tccccacaca 16980  
 tgtggggact ttttaattcca tgtatattag gctgcatgaa gcttccccac aacctactga 17040  
 tgctcttttc attagaaaca tttcttactc tgcgtttcat ttggatagt ttctattcct 17100  
 atgttttcaa accaccaat aaaagattct gcaacatctg acctgccatt aatcccgctc 17160  
 agtgtatttt tcatctcctg tattgtagtt ttcattctca caatccagct tgagcctttg 17220  
 gttatatctt ccatgttgct cctgcactgt ttgaacatgc agaattggcta gtggggcagt 17280  
 gagctgagga gaagggacag aggggaagct cagctgttgg gtctacgggt atgatggaga 17340  
 ccatgcagct gaaagtaaac cgtcaccctt tctgcttcag tgtgaaaggc caggtgaaga 17400  
 tgctgcagct gatgaggctg ggccttaggg tgcggggggt ggtggaatct gcttgtgggc 17460

gggagatgtg gctatgtggc tataaaggat gaagatgaac gccctgtttg cttttcagcc 17520  
 tcgcttggat caaggttaaa aggccggttg tggccttctt ggtggaagaa agagagagat 17580  
 aaggcactgt cctccccttc ggagggtctg gggatacact aatccatcaa aaccactgag 17640  
 ggctgggcgt tgggtgtgac ctgtggtccc agcactttgg gaggctgagc tgggaggatt 17700  
 gcttgagccc aggaggtcaa ggcgtaagca agctgtgac gcaccgctgc acaccagtgc 17760  
 ctgggcaaca aagtgaagact ctgtctcttt aaaagaaaaa agaaaaaaaa gccttttttt 17820  
 aaattaaaaa aaaaatcaag tctacctgaa tggcctgcag ttggaccac aaaccaggta 17880  
 cccaagttac caggcaaggc agctgcagtt gtaccagtca gaagtccaca agatttgaaa 17940  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa cctcaggggt ttcagtgaat gctgtgttaa cttttttttt 18000  
 tgagacatag tticactctt gttgcccagg cttgagtga gtggtgccat ctcggctcac 18060  
 tgcaacctct gcctcccggg ttcaagcagt tcttctgcct cagcctcccg agtagctggg 18120  
 attacaggcg cccaccacca cacctggcta attttgtatt tttagtagag acgagcttc 18180  
 actactggc gtgaaactac agttggtcag gctggtctcg aactcctgac ctcaggtgat 18240  
 ctgcccgcct cggcctccca aaatgctggg attacaggcg tcagttacca cgcccagtct 18300

gcttgtaa ac tttataagt cagatgtttg atgtgaccga gttcaaggct gatacagccc 18360

agagccagga caggctgaga gctgcccatt tttagggcct cagacttcct actgggagca 18420

tcgcagcccc tttgaacag aggtttggag aaggtgggtc atttgagag aagtaccta 18480

aactatccta gtgaaggaa tctatccttg aaagtcacat ttgaaggaat tcaaaaagag 18540

aaaacttaag ggaaaggaaa aaaatagttt taaattttaa agagtgggca tgtgggagag 18600

ggggtggaga tagttaagag ttataggaaa acatttccaa ttaatagag gagaaatttt 18660

atattgggag agttcccaaa attaaatggc cacttgggaa ggcaatacat tcccagacaa 18720

aggcaccagg cataggtgaa cacttgggtg ggatgttatg aaggagactc aaacttcagg 18780

taagcaggta gaacaaattg catataatat ccttcctggc cgggcatggt ggctcacgcc 18840

tgtaatccca gcactttggg aggccgaggt gggcggtatc tgagatcagg agtttaagac 18900

cagcctgacc aacatgggtg aaccccatct ctactaaaaa tacaaaaaaa ttggccgggc 18960

atggtgggtg gcacctgtaa tcccagctat tcaggaggct taggcaggag aatcgcttga 19020

accaggagg tggaggttgc agtgagccaa gatcacgcca ctgcactcca gcctgggtga 19080

cagagctaga ctccatctca aaaaaagaga aaaaaagatc cttccacac caaaagtctg 19140

tagctgtgaa aagtagctac catatagtgc aagttgagat gcataagagg ttataaaac 19200

caccctggag tcgaaggaga gagaactttt ggtagggagt aagtaggttaa aaagggaccc 19260

aaaggtctgg gatcttgaac actgaaggag gaacagtgtt ctgtgagaaa ggtttgtttt 19320

taacatgtta atttcttcaa caaaccattt gaatacttaa tgttggtccaa gctctgggcc 19380

aggacccgga acaacaaaga caaaccagga ccaaagcccc tgactgacgg agttctgcag 19440

tttagttacc gagacagaca catgaacaga tagttcatca tatgtgataa ggtggagtta 19500

gggcacacaa gtgaggcatc taagcaagga aataaaaaata aaaaagtatg gaatagttag 19560

aatacctgtt ttattgatct tttctgctaa ttctgacatc tgtgtctgtt ccaagtcagt 19620

ctccattgac tgattttttt ttgtccctt tataggtgta ttttctgct tctttgtgtg 19680

actggtaatt ttgggtigaa tgccagacac ttgaatttac ctgttgggt tctgggcatt 19740

tttgtatttc tagaaatact attattgagc tctgttctgg gatgcagtta ttaagagtca 19800

gtttgatcct ttgggtctt ctgcaaaaga ttgttaggt gggtatggag cagtgccag 19860

tctagggcta atgattctca actactgggg catgacccaa cgccccagga attatatgct 19920

tttcccagtc cagattctgg gaacaggcac tgtcccctgc cctgtgtggg ctctgtcccc 19980

tccagtcctt ccaggtggtt ctgtctggtc tcaggtagtt tcccaagaca catgcgccga 20040



tcagatctct cagattctct gggcagcccc ctctcactg tcttctgtgc atgacctctg 20100

gtgcctcag tctccccag ttctcagccc tctcctgtgc tggattctcc ccattctccc 20160

cagcctgcag tgctgggtcc tggagactcc ccagggtca ccatgtttgt ttctctctc 20220

tcaggtcctt tgttacctga catggagtac ctgaaagccc gttgtttcat gcattttacc 20280

tgggttttgg gtgcttcag ggggagggtg aatctgggcc ctgctgctcc atcgtgggtca 20340

gatgtgggag ttacacactg gcacactggc ttttttttt ttttttttg agacagggtc 20400

tigctctgtc acctaggctg gagtgcagtg gcacaatctt gactcactgc atcctccacc 20460

tgctaagctc aagccatccc cccacctag cctcccgagc agctgggacc acaggcgcat 20520

gccaccacac ccagctaatt ttgtatttt ttgtagagac agggttttgc tatattgccc 20580

aggctggctt caaactcctg ggctcaagca atctgcctgc tgcggcctcc caaagtgtt 20640

agattatagg cgtgagccac tggccttgt ggacattagc ttttttttt ttttttgag 20700

acagagtctc gctctgtcac ccagtctgga gtacagtggc acaatctcg ctcactgcaa 20760

gtccgcctc ctgggttcac accgttctcc cgcctcagcc tcccagagtaa ctgggactat 20820

aggcacctgc caccacgccc aactaatttt gttttgtat tttttagtag agacagggtt 20880

tcaccgtgtt agccaggatg ttctgatct cctgccctcg tgatctgccc accttggcct 20940

cccaaagtgc tgggattaca ggcatgagcc gctgcaccca gccaaagcaaa atggatttta 21000  
 aaaatgaact ctacaaaac ttgtttctaa tcttgctttc taatagccac gaatcaaaca 21060  
 ctttccttgg cattttaggg ttcatgagat ttgtgtgtgc ctggggaggc agtcaagtcc 21120  
 aaggccigaa gtttgctgat gcagtgccca agcccgggca aatggaagct tgaaattagc 21180  
 cctagctaata gttttttttt tttttcttt ctttctttt tgagacagag tcttgctctg 21240  
 tcgcccaggc tggagtacag tgggtgatc tctgctcact gcagcctctg cctcttgggc 21300  
 tcaaagcatt ctcttgccct agcctcccgg gtagctgggg ctacaggctt gcaccaccac 21360  
 acctggccaa ttttttaatt tttattttta gtggagacac gttttacat gttggccagg 21420  
 ctggtcttga actcctgacc acaagtgata caccttctc agcctcccaa agtgctggga 21480  
 taacagggtg gagccaccat gcccggtcct ggctaattgt tctgagttg gcccagaac 21540  
 ctgtggccct ggggtggccac actgctggct gggagggcaa ctgggtggct ctgcagcggg 21600  
 aagtgtggtt tggagtcagg tctcggtcc tgctctgggg ctggtccacc ctggggctgc 21660  
 tgcgtcactt ctctgagct ttggtgtcct ggtcctgaga gtgaggcagc gaatgccac 21720  
 ctagggggct ctggctggga tgggaagggg caaggagag cctctgagtc aggagccatt 21780

cccggtgagt ggctacctgg gggatgccac ccagggaatgc ttgggtgggc actgggctta 21840  
 tggatgaacgt gaacatgcag gggcagggtgg ggctgatgcc agcactgtga ggggtggatg 21900  
 gtacaaaggc tgcgggccct gagaggctctg agggctcctg cctgtgggca gcgcagctgg 21960  
 gtgggcagtg ccagaaagag actggaagac tcaatgcaga gccagcaggc agcgcagctc 22020  
 agcaggccag agcgcagagg cagatcaggg gtccttagca ttgcgcagct cagccactgt 22080  
 gtgggcagcc gcaggcccag gccctgccc aactcttctg gacctcaca gccctgagga 22140  
 gtgcctgttc ttgagtcctg agccagctcc ccatgctcac ctgctgctt ccttaccctt 22200  
 ccagccgccc agctgggaag gaagggtgtg gtgggtggact acgtggaacc ttctcccaa 22260  
 ggtaggcagc accctatggg agccgggtgt cctggggaag gaggtgggag gtgggcccag 22320  
 ttctgttaca gagggcagct gacaccaaag tccttcagcc ctgctgtcca tggtttctgg 22380  
 acagtgtcct gtttcactca tcattacttt aaagtcttg accattatcg aaaacaactc 22440  
 tggccagggtg cagttgtca cgcctgtact cacagcactt tgggaagcca aggcaggcct 22500  
 tgatcacttg agcccaggag ttcgaggcta tagtgagcta tgattgcact actgcactcc 22560  
 agcctgggta acaagagcaa aactccatct caaataaata aattaataaa tattaataag 22620  
 taaaaacaac tgtttttatt ttcgagtaca gttatagaga gcagattcgt gtggcatgtc 22680

agctgggtctg tgtagagtt acaaagcaac ttttaaggaat tccaaacact ctagaagaac 22740

agggaagcct ccagcagtc cctgaacata aattcaaagt tgctcttccc acgtcccagg 22800

caccgggtgg ggcttcggcg gcacctgcgt caacgtgggc tgcatcccca agaagctgat 22860

gcaccaggcg gcactgctgg gaggcctgat ccaagatgcc cccaactatg gctgggaggt 22920

ggcccagccc gtgccgatg actggtaagg atctggcgcc gtggcattcc agtgcttttc 22980

ttctactctt gggtggaaga ggaagaggag gcttatcctc gatgagccct catggggagt 23040

gggccgtagg atgggtttct cagccagggg cgactctgcg ctgtctgcct cagacatttg 23100

ggaatgtctg gagacagttt tggttgtcac tggggaaggg ttgtctcccc ttgctgggga 23160

gccagggat gctacagcca tgcacagcac agccccacca agaacagtgc atctccaagg 23220

ccaggagtgc gggtagggagg ccgcttcagc tgagctcttc tgggaagggg accacgtggc 23280

ccagccacac ccacattggc tcagataggc ctctgcctgc agtgggtagc ctttggggca 23340

cagagcagct gcactctggag agccgtgggt cagagcccct gtttctgtg agtccaaagg 23400

tctgcagccc tgagcctggg acaggcggtt gcacgtaggg atggatgtca cgttttgcca 23460

cctttaaaag cactcttggt tttgatatt tctatgaatg taccatttga atctaatagt 23520

ccatcgtgag gccctgcagc taacacctgt gtgtgtgatt ttacattttg tttcgtatct 23580

tcacaggagg aagatggcag aagctgttca aaatcacgtg aaatccttga actggggcca 23640

ccgtgtccag cticaggaca ggtacigaag ctctctccgg gaatgggccg ccctctgggc 23700

cttctcttgg gcgttctgtg cctggacaca cacttactta ctgtgcagag catgctctgg 23760

caggctctgg gggttcatgt cctgctcatg ggtggggatg aggacaagga gcagatggga 23820

gtgactgtag gggaagggga gactgccctt tgctgtctgag cagagcctgg aggtgctgcc 23880

aaggaatgag tgaggccaca ttggcagaat ggccagagcc cagggtctga caggaggag 23940

gcgcttgggg ctggaaggcc tcaggccaga gagcgtggac atagctaggc ctggggctaa 24000

tatgtggtga gggtcaccc agtggcaagc cccacccccg tgaaccccct tcttactgca 24060

cacctccagc tccttgggtg tgggtgcagg agcttgggtgc tttccgctgg agcaaatgtc 24120

cctacttgggt caccgttcct gtcagcccct ggggatctcc agcacagagg cctatgctcc 24180

cctggcctac aaccttctcc tggggctcag ctgccagcac agcagatgcc tgaaactgg 24240

accgcctctg gccagcctt tctcccgggg ctgtggaggg gacagtgggt ccgcagaggt 24300

ctggtggctc tctcatgca ccatttgcct ggccccaggg cgggtcttcc tggggcttca 24360

cagcaggcag cagttttgtg ctactaaat ccaggaaagt ggagccagga agccaactgc 24420

ttgccctcca cctggacctc acaagctctc ccctatccag ggagctaagc cacattgtgc 24480

tgtggcattt ctgtgtttct ctgtggggct ctgtatccc tggtacagtt tcctggggac 24540

agcaggctct gccctccctc ctccctgccc tgggcagctc ctggacgggc accaaacagg 24600

cccagcccac tgcctgctcc ggagccacct gcagaaggag gctggggcgc acctgggctg 24660

tttctgcttt ttcactcttc tgaaaagtgc tgccatgagc attgcccggc tgtgtcccgt 24720

ggcagcttcc tggctgtcga ggtgattgaa gggctcttgc ttaggaact tcacgcagct 24780

cagacagccc atagaggcac aggcttgcca gtggggagaa ggcaggctca agcaggaggc 24840

agagccttcc cagaaccctt gctgcagcac ggiccttttg tcattagaaa gtgttggtcg 24900

ggtgcagtgg ctcatgcctg taatcctagc actttgggag gctgaggtgg gaggatcact 24960

tgagcccagg agttggagac cagcctgagc aacatagttt tattgctaca tccctacaaa 25020

aaataaaatg aactagccag gtatgggtgc ccatgcctat agttccagtt acttgaaaca 25080

aggcttccgt gagctatgat catgccactg cactccagcc tgggtgacag agtgagaaga 25140

tgtctttaaa aaaaaaaaaa aggggtggggg ggggtggctc atgcctgtaa tcctagcact 25200

ttgggaggct gaggtgggtg gatcacttga ggtcaggagt tcaagaccag cctggccaac 25260

atggcgaaac cccgtctcta ctaaaaatac aaaaattagc caggcgtggt ggcgcaagcc 25320

tgtaatccca gccttcagcagg aggcctgaggc aagagctgag gcaagagaat ggcttgaacc 25380

tgggaggtgg agattgcagt gagccaagat cgtgccactg aactccagcc tgggcgacag 25440

agtgagactt tgactcagaa aaaaaaaaaa gaaaagaaag cgtgggtcat ttgtttctgt 25500

gcactatgct cccagccact gttttgccag ccttgctatg cccgttctct tgggtgttacc 25560

acaccctga aatcagaagg tgacaccatc tgggtgggcac cacagctccc tgctggaaca 25620

tgtccgggtg atgaggactg tccccaagag aggtccagcc acctcttgct gcacaccagg 25680

gctgtacgtg gccctttagg accgtgctga gctggcttcc gtccctgctt tgacacctgt 25740

ggttaacatg tccctgggat cccctggggga caggcgaggt gccccacat cccctccatg 25800

cttctcagca tggttgccgc ttacctcttg gtccatctga gccacagcac caggccctgc 25860

tgggggctgg agctcccttt taccagtgtt ccctattgat ccagttggtg aggtttaatt 25920

tgagaggaa gtgtttgaaa atcttatctt tatctttcag aaaagtcaag tactttaaca 25980

tcaaagccag ctttgttgac gagcacacgg ttgtcggcgt tgccaaaggt gggaaagagg 26040

tgagcatctg acttactcgc gtggctcctt gtggaccctt ctgcagacct tgggcaccaa 26100

ctgcagctgt gtttggcctg ggtgctgttc ttagtaacac gtgctgctgg aatcaaaaag 26160

gtggcttctt ttgaggctgg gcacttgtct ttaacgtgat caaataattt gctgccctgc 26220

tgctcggagt ggcatggcaa cagggttggg gaccacaccc tttttgcagg attttttggg 26280

gatttgaggg tgccttgaag tgcttggagt tagaacatct ccttgtgctt tctgcctgtc 26340

ccctcctgc caggctgatt gttgatggga ttccagctcc atagggcctc tgaactgctg 26400

gccaagggtc cacgctacag ggcaggggcc gtgggaactg ctggccaagg tctgtggtgc 26460

tcaggccctc cggtaggggt gatcacatg cacctgtctg acccacggct ttctcttttt 26520

ctcctcagat tctgtgttca gccgatcaca tcatcattgc tactggaggg cggccgagat 26580

accccacgca cgtgagtgtc ccagagcat agcgtccctg ctgccgtggc ccattcccgg 26640

cctctttgag ggatacgttt ttacacacgt gcttcccaca gcagcagctt gcacaccctt 26700

tccccctata ctactatca tcactttctg ctttccaatt ctcttgaatc cacactgctg 26760

aaatgtgggg tccccagtgg cctccacgct gccagatcct caggacagct ctcgttctgc 26820

tcctccccctg ccccgctgga tctgtccctt tccacaccag gatcctgctt cctaagtctc 26880

cattgctgat tccccctttt ccttcagcc tcagaatggt ggaacattca ggatataagc 26940

ctcattcttc atcttctcc ttacgtccc ccagtttaaa aaaagttaga aataaaattc 27000



acacgctata aaatttagcc ttttttaggg tacaattcag tggtttttag tacattcaca 27060

gagctgtgcg gccatcagtc accaccatcc attgccagaa ctccttccat catccctgaa 27120

ctgaaactat tccattaaa ccttactccc cagcgctcc tccccagcc cctagaaacc 27180

accacctact ttctgtctct atgaatgtga caacactagg cacctcgtgt aagtgaatc 27240

gtacatgtaa gtccttctca tgtaactggc acgtgtgtgt cccttagtga ctctgtatgtg 27300

tgtgtccctt agtgactggc ttacttcact gagcataaca tctccaggt tcacctacat 27360

tgtagtgtgt gtcagtatca ttcttttta tggctagata ctattccatt gtatggatag 27420

accacacttt gtttatctac ttgcttggat aaacacatgt gttatttcca ctttttagct 27480

attatgaata gtgccgctgt gaacatctgc aaagaagttt ttggtggac ttcagttttc 27540

acttctcttg ggttacactt aggagcagaa ctgctgggtc atgtggtaac tttatgttga 27600

atctttcaag gaacgtttca aggaacctca gactgtttc cacaatgact gtgttttaca 27660

ttccttccag tgggggtgtaa gggicatggc ttcttgttc ttcacgtatc ttgtaatttt 27720

tttattgaaa gctgaacatt tcaaataatt taatgcgata actttggaaa ccagattctc 27780

cctctgcccc aggattctgt tgttacagct gcttatttgg tgacttttcg gaactgactt 27840

tgtagactct tattctttga tgtatgtggc cactgaagtc tttacttggc tagcttagtg 27900

gtcagctaag aactgcatgg agatttcctt aaactaagaa ctctcccggg ctttgctgag 27960

ggctctgtgt gcgtttggag gggatgccit ccacacitcaa caggcagcag acagctctgc 28020

cctagccttc acttcctgct tctgcagaga tcaaggctcag ctggagggtga gggttcaggg 28080

cctcgttggt ccttcctgat gtgtgcacag tgctgtgcat gcgcctggcc taggttccca 28140

ggaatatgct ggaacctttc aaagctccag cagacatctc atactttggc ttttcctttg 28200

aagctttttg ggcagtctgt tgttggctct aactgttacc tatccctca ggcagctgtg 28260

agaagaaaac ctgagacaaa tgccccaga gaaaggcttt tagccctggc tgagctccgg 28320

tgaagttgga tgaagatgac cctatagttg ctgactctga ctcttctttg tgggggggct 28380

ttgaaagacc ccagctgagt tctgctctct ctgacacatc actgttcagg gctgccgctg 28440

aggtgggagt gggaccagag tgagttaaaa caccctggag ttccattct cactcagctt 28500

cagctgtttt tctgacttt aaatgttccc tgtgttgctg caagcctgtg gttaatttcc 28560

ataattctga atctcccagt tcttgccagt tttatcgctg tttttaacag agagggtgaat 28620

aactcctggc ccagctctgt gggttgtggg ggcagagttg aggaaggggc cccgggggtga 28680

ggggttgggg ggcagctgca gcagggaag caaatgggct ggggggtgagc agagaggttt 28740

ggctgagacc agtccccacg ggtctcccag ggaaccgtgt gccgcctgct ccaagcctct 28800  
 aagtaggctg cagccaagct cttgaagacc acggctctct cggcctggag gccacaccac 28860  
 ctctgactta gaccagggg cagtccggtg gaggcagagc aaggggaggt tctgccactt 28920  
 cttggatgtg accccagcct ccacttcgtc ctgtgcttac tgtggaaaca gggaaaggag 28980  
 cggccccgag gagcacaagc acccccagtc cttagaggcc gtgggacttg tctggccgcc 29040  
 aggcagccac agcagcctct agagggggca gggtgcttat gcacagaggt ggggctcagg 29100  
 gctgcgtgac tttgtaggat gacactgtgc agttgttcaa ggcagctgct gcagacaggg 29160  
 tcccagtgat cccctctcct ggcagctggg ctcatggtgg ttctgcttaa agaaggccac 29220  
 agccagcttc cagcagccca gcggtcattg ggtttctctg aggccccagg cagagctgca 29280  
 cgtgcatccg caccagggag cactgcacag gggccctggc ctggcccggc cctgctctgc 29340  
 acctcacggg cagctgctga cggctctttg ggctcacagg ggatccagca ggcgtcctg 29400  
 gtccttagga ggcaggcagc tcagggtgc ttcgtctctc ctgccacgcc ctcccagggt 29460  
 gtctgccaag gcttgcttgc gttttagtcc ctttgattgc cagacctttc ggttttcctt 29520  
 gagtaaacct gagaaattcc tgactttatt ttttttgcc agttggaagc ataaactgtt 29580  
 tgagatccgc ttctccacc agcacatctt gttctcatgg ccgctaaggg gacgttcacc 29640

ctgggcctcc cacctgcttg gccgcccctc ttcaggtgac ctgtatgatt tctgggctca 29700

gagcccaccc gggccagccc tcgagagtgt gaagtcgctc ctggcttcag ccaggtgccc 29760

tcagagctgc ccttcagtcc ctgcccacct cagcctgtgg cacttacccc ctgtgcctcc 29820

tctcctcttg ctggccttgt aggccacccc tgccgcgcag acacacctga gctctgctgg 29880

ccctgatttg ctgacctgtt ctctccccac ttctctctc tgagtttgga tccccagaa 29940

cccaggtgtt gctccctggg gctgcatgcc cctgtctgtt tgatgtgtct gtccagaacc 30000

cgggcagact tgaggggtcc cagctgtctg cctgtatggc ccctgcagtt gctgtacca 30060

cctcaggccc tgtatcctgc tctgaaccag ggtcaagggg agggtcctgg ggaacagagg 30120

ggaaaggtag cctgcgaggg caccgggacc tggagtgcag cagcttagat gcagacaggc 30180

cacctgcagc ccaaagagg ccacagcctg cagacaagga ctggcagcag ggaagccctg 30240

tgcatgtgtg ccctgggaaa gctctgcttg attctgcaa gctggcatcc tctttaagga 30300

agccctagga caggccaaat ggagctcttg tccaaggggt catttctgtc ttgacagatc 30360

gaaggtgcct tggaatatgg aatcacaagt gatgacatct tctggctgaa ggaatcccct 30420

ggaaaaacgt aaggcctgcg cgtgcttggt ggggtcctct tttgttcac cagagtgagc 30480

actggaccct tagagcctgt gctgggtgctg ggctcctggg gctttctttc cggtttaccc 30540

aaaagaagga aaaaaggcct gttatttggt gccagggtgt gtggctcatg cttgttagcc 30600

tagcactttg ggagactgag cgggaggatt gcttgaggcc aggagttcga gatcagcatc 30660

agcctgggca atatagttag acctctactc tacaaaaatc tgttttgggt ttttttttgg 30720

cttttttttt taggtggagt ctactctgt cggccagact ggagtgcaat ggcccaatct 30780

tggctcactg caatccctgc ctcccagggt caagtgttc tcctgcttca gcctccaaag 30840

tagctgaaat tacaggcgcc caccaccaca tctggctaata tttgtattt ttagtagaaa 30900

tggggtttca ccatcttgggt caggctgggt ttgaactcct gacctcaggt gatccgcca 30960

cctcgtcctc ctaaagtgt gggattacaa gcgtgagcca ccacaccag cctacaaaaa 31020

tctgaaaata ttaaccgagc atagtactgt gcacctgtag tcccagctac ttgggagggt 31080

ttaggtggga ggattgcttg agcccaggag gttgaggctg cagttagctg tgattgcacc 31140

actgcgtca gcctgggaga gtgagacctt gtctcaaac taaacaataa acctgtgact 31200

tgtgcccctc tgcagggtgt ttgatttact ctgtcctgtg gctgccttgg aggtataaac 31260

aataacagga ctgccatata aatggagtca gctgtttgtt atctaggtca gtggttgtca 31320

aatggggttc ccaggagccc tggggttcca gtgggtcccc tcaaggacat cagggagaac 31380

attaaggagg ggagagccag caatccctat ccagcncctc atctaacacc ctactgtct 31440  
 tctgatttgt acattgggtt tccctgaaat ctagcaaaga ctcaaaggc ctcaaaaaca 31500  
 acatcttgat tgtggaaggg aggctagcag cgtgcaagtg gctctcactc cccatgggag 31560  
 caggtgcaga gtcactaagt gcattccgat gcccacagag tgggccatcc cgaggtecca 31620  
 ggtccaggca gctcctgcct gtggggtgtg gagacttcat gttggcaggg agcagagaga 31680  
 ccaccagagg gcggcagagg ctgtgtcaat agcagtctcg agccttcccc aggagaaaat 31740  
 atcagtggaa aagggtccca ctctgtgtg tggccgaatg tgcattggtg gcgtgcagat 31800  
 gtgtgtggtg tgtgtgtgtg aatgggtgtg gtgggtgtgtg tgtgagtgtg gtgtgtgtgt 31860  
 ggtgtgtgag tgggtgtgtg gtgtgaaggg tgtgggtgtg tgggtgtgtg gtgtgtgagt 31920  
 ggtgtgtgtg agtgggtgtg gtgtggtgtg tgtgtgaagg gtgtgggtgt gtgtgggtgt 31980  
 tgggtgtgtg gtgagtgtg tgtgtgagt gtgtgtgtgt ggtgtgtgtg gtgtgtgtgt 32040  
 gtgaagggtg tgggtgtgtg tgggtgtgtg gtgagtgtg tgtgtgcgtg gtgtgtgtgg 32100  
 tgtgtgtgag cagtgtgtgt gagtagtgt tgtgagtgt gtgtgtgtga atggtgtgtg 32160  
 tatgtgagt gtgtgtgagt ggtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgagtgtg tgtgtggtgt 32220

gtgtgtgtgg tgtgtgtatg tgagtagtgt gtgagtgggt atgtgtgtgt gtgggtgtgtg 32280

tgtgtgagtg gtgtgtgtgt gtgtgagtgg tgtgtcacat gctctgcttg tcattgtttc 32340

acatttcacg gggcatcttt gtgtggggtc aggactggat tcccttgaat ggatgtggta 32400

tagttccttt gacctttctc ttgttaatga gcatctcagt agtttctctt ctcatcatt 32460

atcaatgctg cagtgaaaac ctgggagggt catctgttta ccatcagaag tgcttctgac 32520

acattttccc aattattcat tgtgataaaa cagacatagt ataaaattta ccactttaac 32580

cttttttttt tttttttttg aaacagagtc tcactctgtt gcccaggctg gagtgcagtg 32640

gtgcgatctc ggctcactgc aacctctgcc tcccgggttc aagcgattct cctgtctcag 32700

ccctctgagt agccgggact acagggtgct gccaccacac cccgctaatt tttgtgttt 32760

ttagtggaga tggggtttca ccatgttggc caggctggtc tcaaactcct gacctcaggt 32820

gatccacctg ccttggcctt ccaaagtgtt gggattacag gggtgagcca ccacgcccag 32880

cccacgttaa ccatttttaa gtatacagtt caatgggtatt aaatgtatta ataatgtcgt 32940

gaaaccatca ccactatcca tgtctggaac tcttttcac catgttgtat ctgcatttcc 33000

ttctttttta gactgagtaa tattccattg tacaggcaca ccacattttg tttatccatt 33060

catctgtcag tggacaccca agttgcctct gcttcttggc tgttgtgagc agtgctgccg 33120

tgaacatagg tgtgcaaata cctcttgaag acctttcagt tcttttggat gcaaaccag 33180

aagtgggatt gctggatctt atggcttga ggaacctcca tctgttccc aacagcgccc 33240

acaccatctt acattctcac cagcagtcca ggaggactct gggctcccca catcctcgcc 33300

agtgcatgtt gttttctgtt tttctttctt taatitttat tttttcctt aaactgtttt 33360

cttgaatgtt tctgtttttt tgacagtggc catcctagtg gctgtgaggt ggtcttatac 33420

gcattacaag gggagctgcc ctcccgctctt aacactttgt gctgacaggc caattccatg 33480

tgtactctgc ctgcttccct gtccttggta actcaggcat cagctttttg ataagacaca 33540

aaacagaaag gagcctctcc tcccataccc ctggcctggg cagtggtcac tgctacccat 33600

ggcgcccaca ctctcctgag agcagtcact gctacccacg gcgcccacac tctcctgaga 33660

gcggtcactg ctacccacgg tgcacccaca ctctcctgag agcagtcact gctacccacg 33720

gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg ctacccacgg cgcccacact ctctgagaa 33780

cggtcactgc tccccacggc gccacactc tctgagagc tgtcactgct acccacggcg 33840

cccacactct cctgagagct gtcactgcta cccatggtgt gccacactc tctgagagc 33900

ggtcactgct acccacggcg cccacactct cctgagagcg gtcactgcta cccatggcg 33960



ccacactctc ctgagagcgg tcactgctac ccacggtgcc cacactctcc tgagagcggg 34020

cactgctacc cacggcgccc acactctcct gagagcgggc gctgctaccc atggtgcgcc 34080

cacactctcc tgagagcggg cactgctacc cacggcgccc acactctcct gagagcgggc 34140

actgctactc atggtgcgcc cacactctcc tgagagcggg cactgctatc cacggcgccc 34200

acactcctga gagcggtcac tgctaccac gccgcccaca ctctcctgag agcggtcact 34260

gctactcacg gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcaccacac 34320

ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gtgcaccac actctcctga gagcggtcac 34380

tgctaccac gccgcccaca ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gcgcccacac 34440

tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcaccacac ctctcctgag agcggtcact 34500

gctaccacag gcgcccacac tctcctgaga gcagtcactg ctaccacagg tgcgcccaca 34560

ctctcctgag agcggtcact gctaccacag gcgcccacac tctcctgaga gcggtcactg 34620

ctactcacag cgcacacact ctctgagag cggtcactgc tacttacggg gcgcccacac 34680

tctcctgaga gcggtcactg ctaccacagg tgcccacact ctctgagag cggtcactgc 34740

tacttacggg gccacactc tctgagagc ggtcactgct atccacggcg cccacacct 34800

cctgagagcg gtcactgcta cccacggcgc ccacactctc ctgagagcgg tcactgctac 34860

tcacggcgcc cacactctcc tgagagcggc cactgctact catggtgcgc ccacactctc 34920

ctgagagcgg tcagtgtac ccatggtgcc cacactctcc tgagagccgt cactgtacc 34980

catggcgccc acactctcct gagagccgtc actgtatcc acggcgccca cactctcctg 35040

agagcggcca ctgtactta cgggtgcgcc acactctcct gagagcggtc actgtaccc 35100

acggtgccca cactctcctg agagcggcca ctgtactta cggtgccac actctcctga 35160

gagccgtcac tgctatccac ggcgccaca ccctcctgag agcggtcact gctaccacg 35220

gcgccacac tctcctgaga gtggcactg ctaccacgg cgccacact ctctgagac 35280

tgtgctgagc ttgtgctggt ttccatcgac tgccgtctgc ctccattgg acccactgat 35340

cgtggtttgt ctttgactt ggtgatagta ttcatgcag aaattttaag ttttctgtt 35400

gtcacaccaa tcacttttc ctgttatgcc ataatttctg ggttatctgt tttttatct 35460

ttgagacagg gtcttgctct gtgcgccagg ctggagtcca gtggtgcgat catggctcgc 35520

tgcagccttg atctcctgga ttcaagcaat tctcctgcct cagcctcctg agtagctggg 35580

attacaggcg ctgccacca cgccagcta atgattattt ttttagggc aaggactcgc 35640

tatgtggccc aggctagtct tgaactcctg ggctcaagt atcacctgg cccctcaaag 35700

tgctgggatt acaggtgtga gctacggcac ccagactgtt ttttaaatct ttgactatct 35760

gctgagttac acatgatctg actcigtgtt catttgctgt gatcagtggg cttttcacac 35820

atttacctga aaagcctcgt gtcacagcct catttgagat gagcgtgtct gtgagcatgc 35880

ccatgtgtgc tgcacaaatc gccagcatgg tccttgtcca ctttcacgtc tggcttttct 35940

cttctcttat ctcttcttac cctccagctg gtttgtgtat tagggatgtg atcctctgtc 36000

gcttgtgggtg cagattttct cagcttctag tgtcttttaa ctgtgtgat gtacaaatgg 36060

tttaagtttt ttttaatgta acttaaactt ttacactta gtggcttttt gatttattgc 36120

atgttcagaa aggccctgcc caccaccaag attttttttt ttttttttta agccctgtat 36180

tttccttatg ggcgtccaca agtcggattt tcttttactt ccttgggctg gctgcacttc 36240

ttctgcggtg tgggtggagat ggggtgcccc ggccccagtg cccatctcga ggcactgttc 36300

tcactcggcg tcctgagttc tgcctgtgcc tctggttgtc tttcacgtag gcttctctgg 36360

gtggagtctg gatgcccctc cagcccctgc aggatgcttt gtctgtctga ccttcaggga 36420

aatggccttg gatgtctggc agccccagga tgtctgtctg gccccctcga gtactggggg 36480

cttcggtgac ggtcactgca gccagcact ttaccacccc tcgttgtgcc tgttcccctc 36540

agaggctgcc cgcttgggcc tggggagggg gcccggtgct ctgggtgccc tggccttgct 36600

gtctccctag caaggtggct ggggcttggg gagcgctcct ctgcaaccct gtgctggggg 36660

cagctggctc ggccgggaag acacagctcc agatatittg ttcagaaaag aaactgcagt 36720

gtttattttc ttcagaaaaa aaacatttag aagatTTTTT ttaaagctct ttcgtttaga 36780

aggaatctag gtatgttatt gtttaagaaa aaaagtgttt gcaatgtatc agtcacccgt 36840

ttcattctga gcatgatita tgtgaggaaa tggTTTTTT aaaaattaag ctggagatat 36900

atccctgtac gatgcttctg tgaaaatgcg gcttttgtcc ggcgctgta atgcaagttg 36960

taacagtgtat atatgggagt cagtgtttac atgttacatt cctctgctgc agtcaaaata 37020

agcccggagg gtctacagta gcatttctgt attttatcag ctgggctgg ggctgagggg 37080

aggcctccac tcacacttgg aggggctgtt tctgccagat ttatttgcct tataaatatt 37140

cccatgttt attttaactc gcctttaaaa tggagctgaa attaatatgg accccggggc 37200

tgctccccctg gcccctgagt gcctcccgta gtcgggtggg acatttctac ctggtcccat 37260

cttgagggcc aggtgcgcaa ctacaggtgc ctggcatcac agtgcacctc ctgcagtggg 37320

cactctgtcc cctggttggc tctccacca aggaggctcc ctgtccccct ggccccaggc 37380

cctcggtggg ctctgcggcg tgcacgaggc ctccctcgtc cctctctact acaggcacag 37440

gctgccacca ggaactcctt tcagcgcacg tctgtgtggg gccactgcc gggagctcca 37500

gatctggcga gtggtgcca cagtggggcc tgggaccag cctgcaagg cgtaccatgc 37560

cacttttgcc ccagagaggc cactcaggca tcacagtga cctcggggcc caagttggga 37620

gcccccttcc tcctttgttt gcatccagg cttaggaggc ccagggtgg acagatggca 37680

gaggcagggg gatcgtgtcc aagctcagtc aaggggagac agaattaaac agtgcacttc 37740

actaaacagc catatgctgg caaaatgggg ccatacctgt tgaccagagt gggctgagca 37800

cctggtttgt aacctaggag ggtgaggaag acgtgcagaa aactcagaaa actcctgaaa 37860

aagcagtgtg agcttgtggg tgggtgagca ggacccttga gtgcactggg gtggggcggg 37920

ggacgttctg gctgccccac tcccatagcc acgccctggc gcaagggact gtcctccag 37980

tcttgggtggg gaccctggga aggactccag gtcggctcct gctccgccctc tgccatgcag 38040

atgcccgcct tgtgccagcc cgtttgcctt ttctgctgtg ttgtgtcttt cttctcttgg 38100

aactgcaaga caggttgaag aagagaggag gtctctgggg aggtacagt accctgggca 38160

ggcagtggag cccctctggg aacaatggcc actgcaggga ggcaggggtg cggaggggca 38220

cgtgacccca aatgactagg ctgagagggg gcatgcagcc ttgcaaacca aaccttccat 38280

tccacagagc aagccccgg caggtggagg aatgtggaag gcgaggatgg tgagcccaca 38340

ccggggagct cctttacaga ggcaggcact gggggtcggg atccaagtgc agccaagagg 38400

agccccgaggc ccagaggggc ctggcaatta agggggggcca aggagctgag ctccaactcc 38460

agtcccacag ccgcacaatc ttcctgccac ttcctgacct ggagggtgc ctccaccggg 38520

aagccctccgc acccggcagg gacttgggcc ccgccagtgt gccttgtctc tgcctcttgc 38580

acaccacagg ccttgggctt cgtcttctcc ctgagtcca ggttttggag ctgaggtgcc 38640

ctaaccctaa tataggaat tgtggctcct ctattctagt cctccctctt gctgtgtctg 38700

taggtccgct ttctgcaaag cagggtcttg agctggcaac actgggatgg ggccgagggc 38760

gtgaatgaga ccgcagcctc ctctcaggtc cgataacgga agtactgctt cccggaaca 38820

accaggtctt gcctgttctt gctgccagct ctgtagcccc tgcccaggtc cccgtggggg 38880

tttacagagc atggggccag cctctcctgc agctgccagg ctggctcagg ggctgaccag 38940

cccacacact gggccctggg ggaggggctg cagccagcca ggctgtcca ccctctgagg 39000

ctgctccacc agcctgctgc tgtctgtcct cgcactcctg gggctccaag aggagagtg 39060

tttttataac ttgggctggt ttaaggctgc ctgtcagtgt gtcattgaaa gagcttttat 39120

ttgaccctta ggaagtccgg aagccagcca ggtactgcga tcatttttct ctcttcctaa 39180

gcacaagagg gaagaagata aatittatct tgggaagaac cacagccatt tgggagaaaa 39240

titaatttaa gtggcacatt ccgctggtgt gatgggatgt ccttgtgttc agcaataggg 39300

agaccagctg tcctccctggg gcttgttacc agactgcaaa gcccttgcca cctctctgtg 39360

tgcgtccctg tggctaagac atgacaaggt agggctttca gtggcatttg ttacagggcc 39420

agcacacaga ggctccggcc cagcatctgc ccctgagggg ttgggtgggg cggcgggggtt 39480

ccagccaagc cggggaagga ggcccttcgt gcacccccag ccctgtgctg cctccctggg 39540

gcatctgcag ctggcgggcc catctggtat ttcctgggct ggcaggacct ccaagggggcc 39600

aggigccicc catgagactc actttgtgtg agtattccct ctggagagca ggccttcaag 39660

cicaagaggc agatggattg ctctttaagc ctaggccttcg tgggcctgaa ttaatgcttt 39720

tgtttctgct tcctcccccc attccaattt tgaacaagaa agcctgccct gtgattaggc 39780

tcatccigca gtagttattt tgcctctttg gaaaatgttt gcacaccaa aagcacagag 39840

agctgagctg ctgggatcac atggaaaact gatTTTTatt tgtttgttt tgtttgtttt 39900

agagacaggg tctcactctg ttccccgggc tggagtgcag ctactgcag cctcaaactc 39960

ctaggctcaa gtgatccctc ttccctcagcc tcccagtag ccgggactac aggtgcatac 40020

caccatgccc cagtaatttt tttagtttgt agagatgggg acaagctgta ttgctcaggc 40080

tggctcttgaa ctcccgggct caagcagtct gtccaccttg gcctcccaga gtgctgggat 40140  
 tgcacacatg acccaccgca cccaacctct gggctcttta atgcagcggg aagttgagtg 40200  
 gticcagccc cctaccccca ggtcctgtga gctgggtccc tgacttctgt ggccagcacc 40260  
 tctgacttcc tgtggccagt catggcttga gttggttgct gcaccacgtt cctgtctgtc 40320  
 cctacccctg ctgggccgtg aatggcctga agaagggtgc tgtagggtccc tgtctttggg 40380  
 tactctctat ccctgtgatc tggaggcttt ggtgtctgtc ttattttgct cgggcatttt 40440  
 tttacttttag ctggcttgaa cggagtcttc tgttgggaatt ctcgtatcct gcattcttca 40500  
 aagggtaaac attcacataa tttgatcaat gcggggaggc gtacagtga aaccaatgct 40560  
 gtcaataatc ctgtctcatg acaacaagaa gaggcccaaa atgaccctcc acacgagcga 40620  
 gacgtgagct tttgttgaga gatttcagcc gaacacatag ggtcaaggat gccactcgg 40680  
 gaataatgcc actgcacca cctcctccta gcgtaccct cagttgctga ttacagagctg 40740  
 gcagctgagg gatgggggca cctgtgactt tgaagggtgc ccttgaggcg ggagcttctc 40800  
 ctgtgccccg tgggtgccag gacaggaggc ccgggcactg ggggactccg agggagggcc 40860  
 tggagagtca cctgcccccg ctccaatcca ggcttggtgg gtcagcatcg ttaggaggt 40920



ggggatgtac acgtcggtgg cagagacagc aaacatttgt ggcaaaatca ggagggtgtg 40980  
 ttgctgtatc cctagcaatg agctaggagg cccggagagc agcctggccc ccatcctgca 41040  
 gctgcagggc ccatcctgg agaagggttg gccttcaggg ccaggaaggc cctgacgtgc 41100  
 aggggcccag ctgcccacag aggggatgca ttggcctcac tctgccagtg cctgcacagc 41160  
 ccagcaggaa gcatctagcc catgcacagc cacctctggg agcagggggc aaagggcacc 41220  
 acacaatggg ctctcgccca gttacaccct tgcatttagg gcaggatatg caaagcagca 41280  
 gagttctgtt tatatttgca gtaactcata acttcatatc ttttttttt ttttgtgatg 41340  
 gagtcttgct ctgttgccca ggctggagtg cagtgcacag atcttggctc actgcaagct 41400  
 ccacctctg ggtttacacc attctcctgt ctggcctcc ccagcagctg ggactacagg 41460  
 cgcacatcgc catgctcagc taattttttg tatttttagt agagatgggg tttcaccatg 41520  
 ttagccagga tggctcgtat ctctgacct cgtgatctgc ctgcttcggc ctcccaaagt 41580  
 gctgggatta caggcgtgag ccaccgcacc tggccataac ttcatatctt aaacaaaagc 41640  
 ttgtaccttt cactgcatat agcaagtcca aaaagagttt ggtttcgcca ttttgaagt 41700  
 gcacttccgt gtagagatgt gtatgtggtg cctatgtgtg tgtgcatgtg tggaagtgcg 41760  
 tgcataccgt ggtgcctgtt tccaagtgt tgccggccct gagcggggct gggaatgcat 41820

ctctgcaatc ctgcttggct ggggggtccca ggggtccccct tcgctgtcct cacatgctga 41880

gtgaggcatg taaccacctt gtgctcagcc ggccaacaga gctctgtctg ctcaccctaa 41940

tcctgacagt ggtgcggttc tgtccccagc cacagtgagg aagctgcatg ccagatgctt 42000

cccgcagggc acctgcagaa tgattccaag ggatacaccg tgttttgaaa tggaattata 42060

tcattagtac ctgctgggat tagcaatgac attgggctta tccgtcctta catcacctcc 42120

tcttgttcaa agactgaagg gtaatgtggg agcccaccca cgtgcagctg ccccgtggg 42180

agttcttgtt cgtgttaggt tctgtgcccg tttgcatgtg tgtgcatgca tgtgtctaca 42240

tgagtgtgtg catatgtata tatgaatgaa tgtacccatg cgagtatgtg cgtgtgtgtg 42300

tacatttgtg cccgtgtaag agtatgtgca tgcagggtgtg tggcatgtgt gcacatacaa 42360

gtgtgcgtga gtacatgtgc atgcaaaaca catgtggagt gtggggttga acaatagagg 42420

gttttcaacta caagagcaaa tatttccaat gactgctggt cgcagtgtcc tgtgtgcct 42480

cccttgtccc tggggtcctt cagtcacctc tctggggagc tggccctcct ggccctgccc 42540

ctagctgtga tagggttgga tgtgcctctg gcacatggaa gggcccagcc ttctgtggtc 42600

ttgagagtgc tttgctcaga tgatgtcttc ccttgcggtc tgggtggcctc cccatcctgc 42660

caagcatctc ccagcttcca ccctagccca ggaggccccg gggggagaga aggaaagcca 42720  
 tgtgtgtctc tggatgatgt ttctccatgc ctccgggtgc ctccagggg acaggtacca 42780  
 ctgttacttg acacacacgc ccttaccac caggcgattt gctgattcac aacatgcttg 42840  
 acagtgtagc ctgggaaagt gggctttgtc ccctggggca agctgtttga acagtaacct 42900  
 tggagcccac gagctgacca agggcctggg caaaggctgc ggggttctgc tctgactgca 42960  
 ctgtgtcaat aagggcctca gctttacatg tgctctctct ctgtttctct aacaggttgg 43020  
 tggtcggggc cagctgtatc ctttgcaagc gtgcagggtg ccgtcctggg aactggacac 43080  
 tccttccctt gagtccctcc ctgccacccg cccttccggc aggcctcttg ctgcctcaga 43140  
 tcggcactta ctgggcctct cggcgtggag gatctactgt gcctggggac agtttgaggc 43200  
 tgacctctgg ccagggattc ctggaggctc ttcttgagct gggacagctg gacatggcca 43260  
 tgaggcagct gggctgtcct ccctcaagag cagccccagc ctggacccat tgcttcagaa 43320  
 gggacaatta gacaggagg gtcaggagag gagctgcagg agggcctggg gtcaagggga 43380  
 catctgaggg agatgaaagt ccctggccgg gcgcgggtggc tcatgcctgt agtcccagct 43440  
 acttgggagg ctgaggcagg ggaaccgctt gaacctggga ggcagacgtt gctgtgagct 43500  
 gagatcatgc cactgcactc cagcctaggc aacagaatga gactccatct caaaaaaaaa 43560

aaaaaaaaa aaagcccaa gccgctggct gagagcacag gtggaagaaa gcagctgcct 43620  
 ggcatctccc gtggctgagg tcctccctga accagccact cctctccatc ccaactggaa 43680  
 tccaccagga tgcaggcctc gccctggagc cgggatggac agcacatggg agcagaggcc 43740  
 agaggccggc ctagtccgtg ggtgctgctt ggcggctcct tgctaacccc agcctgtgca 43800  
 ctgagatgt ggaggtgggg gtcttgagtt gggagcctcc tccagggcca gccatggatg 43860  
 ggtggggtgt gggctgtggc acagggccct ggggtgttgt cccatcattt ccaaaattgg 43920  
 gatctacagt gtccttagc tggcacccca cagatgtggc cctggagtgt gctggcttcc 43980  
 tcaccgggat tgggctggac accaccatca tgatgcgcag catccccctc cgcggcttcg 44040  
 accaggtagt gctggaggcc ccagctcccg cccctgtggc tctgaggcct tcctcccaca 44100  
 gccccctccc aggcaggtgc agtgcagtca tgggccacga gtgatgcctg aatctttaga 44160  
 gataaccctt gaattggatg aggaggttgt ccaggaaata tgcagacact cggccggagc 44220  
 gagggaggag ggtggcagt gggcgcacag ctgcacagag gcctccagcc gaccacaggc 44280  
 acagtgaagg gaggctcagc ccagccttgt gccggcagag caggtcaccc tccgggtcgt 44340  
 cccattagta agaggccggt gtgtgctgca gaagtgttag cccacacctc gagaccccca 44400

actccctgct ctccccttgc ctgtcccctc tgagggagtg ggggtgaaat aagctgtaat 44460

gtgtgagctg ggggtaggga cacagggcag cgctggctcc gagacagccc gtgggatctt 44520

ggcttctgga cagggtcgct gtgtacagt gccttcatct gtgtctgggg tacacacact 44580

catgtggcca gcaggacgag ctccatagatt ggagcaatag agattttctt ttttagcta 44640

aaaacicttc aagggaagt ctccgttaa aatagaagtc tggagttgtc attgtggaga 44700

tgtcaaacac tccatgactg ccacgaagga ggccccttgc agggtagct gtgcagatct 44760

gcaggccctg ctacaggtcc tcggccgacc ctacagtcac agagcctgag gaggtcacct 44820

gaggtgggag gagccaggcc tgtcatctcc agactcccag tgccaccccc aggctgactc 44880

agagacgtgt ccctccaccc gtgtggccat gtgttgttcc atcctaaagc tatggcacac 44940

tcccatcatg tccctcagt caaaccaccc gagccctgtg gtagggacgc agtgtctagg 45000

aaggcctcag agccttcaga tgtggggagg gtgagctggc agtggacgga ggaggaaagg 45060

ggcctgcaga atggggggccg tgcccaggca aggaggatgc acagtctagg cagccaggct 45120

gaggggcgag ggaccctgtg tcctggacag gctccatggt tctccctcag agcctgggat 45180

ggccatgcc tccaggcctc tggaggggtg caggagtgat gaacagcctg tgcggcagcc 45240

ccctctgcagc acagccagcc ctgcccggcg ggccagactc ccacacacgc catctagagc 45300

cagctggcac acccgcacag gtgtcagagg atgtagcag tgactgtttt tctcctcttg 45360

aaaccagaag ctgtggccag cttcactgct ggtccgtgca agtccccatt gtcctgggaa 45420

cagggccccc atctgtagct ggacttgggg cgcacaggcc tcctgggccg ggaggagaa 45480

gcaggactct ctctgtccct gatctggacc tgagcctgct gtgcctacat ttctaggcgg 45540

gagcagagtc tcctacctac cctcctggct cctggatggc agaggggcat gttggccaca 45600

tgtggagggg tgggccagga gcaggggcca tcttgttggg ccagggcaca gtcctgggg 45660

gaaggcacgc ttctctgcca ttggtttttag tgaagactaa gttttttgtt ttgtttttt 45720

aaagaaatgt gtagatgtac caggatttgt ttgtttttct tctttttttc ttctttttt 45780

tggtttgaga cagagtctca ctctgtcacc caggctggag tgcagtggca caatctcggc 45840

tcactgcaag ctccacctcc cgggttcacg ccattctcct gccacagcct cccagttagc 45900

tggaactaca ggtacctgcc accacgcctg gctaattttt tgtgtttttt agtagagaca 45960

gtgtttcacc gtgttagcca ggatgatctc tatctcctga cctcgtgatc cggccgcctc 46020

agcttctcaa agtgctggga tcacagggtg gagccatcgc accggcctt gcttattttt 46080

tcttttagag atagagtctc actctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcacag 46140

ttcattgcag cctcaaactc ctgggcttga gggattctcc cacttcagcc tcccaaaagg 46200

tiggattac aggtgtgacc gtatctggct gatgaagact tagttaatta gcatctagag 46260

aggagccac aggctgagtg aatcctgacc atagggccca gggttgagga ctiggagcca 46320

ggacaggggc tagacactcc acagagagca agaggacgta gagcaggggg cagggtgtct 46380

caccccgctt tccgcacaga cccctctccg cccttcattg aggccttcga gagcagggca 46440

gggccagagc ctctctccca cggccacctg gtcttcattg cctgtcttct tgtgctttgc 46500

agcaaatgtc ctccatggtc atagagcaca tggcatctca tggcaccggg ttcctgaggg 46560

gctgtgcccc ctgcgggtc aggaggctcc ctgatggcca gctgcaggtc acctgggagg 46620

acagcaccac cggcaaggag gacacgggca cctttgacac cgtcctgtgg gccataggta 46680

agggcacgtc gagccacacg ctctgtctct ggctctcccc aggtgcatgg agaatctttg 46740

ccccacttcc tgtcacctcc cagggtctcc ccattctgtt ggctgccagg cgggttggcc 46800

gctccccagt gcacctcgag agcaaccgtg aaggcctgtg gggcggcact cacactaggc 46860

tgtgcccata ttgccatccc cagcaccttg catctctgcg tgtctcccca ccaccgtggg 46920

acatgtctga aaaaaccaga gaagagactg agacggcatc agccaggtgt cctcatcgag 46980

gatcaactag gcaatcatcc tcgccttccc tggcccttga gcaattgctt attaaggttt 47040

cagcacataa atcctacttg tcaccticca ggtttaagtc ttggtatggt tcttttcttt 47100

tttttttttt ttttgagatg gagtctcgct ctgtcgccca ggctggagtg cagtggcaac 47160

ctccgcctcc cgggttcaag cgattctcct gcctcagcct cctgggtagc tggggctaca 47220

ggcgcccacc actacacctg actaattttt gtatttttag tagagacggg gtttcacat 47280

gtaggccagg atggtctcaa tctcctgacc ttgtgatcca cctgccttgg cctcccaaag 47340

tactgagatt acaggtgtga gccaccgcac ctggccagta tgtatttttt cttagcata 47400

ttaaagtgtt tgctgcttca ggctttccag ctaggttttt ttcttttttt gcgtgtgaaa 47460

caggtctctt ctctgttgcc taggaggagt gtggtgggtg gatcatagct cactgcagcc 47520

tccacctccc aggctcaatc aatcttccca tctcagcctt ctaagtgtg ggattacagg 47580

tttgagctac tgtgcccagc caagctagtt tgttggtttt aacataaaaa tgatatggat 47640

ttgaaagttt taaaaattat ggtgacatac acataacatc aaattcatca tcttaagcat 47700

tttaaagtat atagttcagt ggtgttaagt acgttcatat tgtacaagca gcatgacat 47760

ccatctctag aacttttcca ttatctccaa actgagctct gtccccatta aacactcact 47820

ccctgctgcc cgggcactca cctttcactg tgtgtctctt tggatctgac tcctcgaggg 47880



acttcatgta agtagaatca tgcagtgttt gtccttttgt gactggctca tttctcttag 47940

cacaatgttt tcagggtgca tccatgttgc agcatttgtt agagtttagca tttgtgtagc 48000

atgtgccagc atttccttcc tgttgaaggc tgagtgtat gtgtgtccat tatctgtcag 48060

tggacactta ggttgcttcc gtcttttggc tgttgtggat catgctgctg tgaacatggg 48120

tgtgcacaag ccgctgttt tcagcacata aaaatgacac agagtittta aagttctgtc 48180

cagccttctc gtggctttca gtgtttccca gtgggtccct ttgggcctgg caggatcatca 48240

catgccagga gtggcatttt gcaggccttt ccagaagtca catttcgaag gcttccaaag 48300

acatcacctt tccagtgtg ggagaggcc tgggcgtttc ccggccaggc gtgggctggc 48360

tacaacttgc tgggcacagt ctggtctcac ctcttgctc tctgtcaggt gtaggtccgg 48420

ttttgcatgg ggagtggtc gagcaggtgt ggggagtgtg gacacagcca ggggatacct 48480

gtgcccaggc ctgggcccgg gctgtctgac gggactggca aggggcagct ggagccaaca 48540

gggatcgccc agacactgct ctgtcccagg cctgtctgag aggaggccat tgcagatggg 48600

ccgccgaag gagggctgcg ggttctcgtc agggtgggtg gcggcacaca cagcatgcct 48660

gctcagatgt cctaccacc tcggtgcctg gccgtctagt ttaggctcct agttttccca 48720

atcacctgt caacttgcatt gttgaaggcg ggagcaacct agtcagtgtt gtagttctc 48780

cgaggccttt ctgtgctgag cctgggtccgt tgtcccctgc gagagcccaa gatcagagcc 48840

agggtccctc tcagatcacc tgcctccacc tccatcagct aaccgggctt gcgtggggct 48900

ggccaggggt cagtgtctcc tgggggaggg ctcccagagg cacaagctgt gtcatagggt 48960

gatgcacttc tgaagcagtc actcggaatg ggaaatcaga aaggaaacca gcctggagcg 49020

gctgaggctt cacttttgtg cagtggacac aagcgcagag gtgatgaccg gggaggacct 49080

gagatgccig agcgcacgca gggctcttgg cccggagggtg atcagtcagc aagagcaatg 49140

ttctcagcca cgttgtaaaa gtagatttta agtaagttaa ttatgataaa cactacgaag 49200

gattaggtaa catitttgac tctggagtgt actgatgggt ctcatcctaa actccacttt 49260

atitttcttt caaaatttat cctcctactg tcattcccaa ataaactcca ctctaaaggg 49320

gaggtggcga gtttctccct cccaccgcgc cctagccctc ctctctgtc tgctgacacc 49380

tccgttcacc cacagcataa gggagctgtt gccattgaac cgaggggagc ccctcgacca 49440

agcccatagg gatgtagcag accaatgggc cgggggctgt gtccccggaa agccggggcg 49500

tcagcctggc aggcaacaag cgaggcccct ccctactcag cagagctgcc gtggcctgca 49560

cgcccatcct cccttgctag gagtctgttt tatttttttg tactttcaaa atgagcatcc 49620

cccagacagt ctgcctggca tgattgatgc tgggggtgga agcttttcac agtccttggc 49680

ccttgaccct gcttcccagag ggCggCgCgg ctctgcgcg cctgctgggg gccgctcggg 49740

catgtgctga cttcgctgct gctcagagcc aggttttgta aacattcagg agccacttcc 49800

caggtcagca actgcgagcg ttttctgctg gttgtacga taagccitta accaagcttt 49860

atttctactt gcaataaagg atgatccact ctgggagggt aaaataaagc gccctagggg 49920

cggcacagct ggcaatgcc aatctccga ctctgcttcc tgtaccgggt gtgcactacg 49980

tccgcacaag ctgggctccg acaggaagg gggatgcctc cgtgcccgggt gcacacacac 50040

acagaagggg cccaggtgct gcacagagct cccgtgtggg gccgagtgct ggccctgccc 50100

gttgcccgtg tgcctggcgc ctggccgcag ctggcgagga ccatggacat tggcattgcg 50160

aagtggggcc tgcagtctgg aagcagagga ggaccagagc cccttcctcg acgcagcctt 50220

gatctccacg tgggtggatta aacatattag cagttaaagc agttaattgc tgtgcagggg 50280

gccccgctc attgtttgtc tctgaatcac ccgccacac cagggtgctc agataataga 50340

ctgggaactt cagtgaggag gatttcctgt ctgcagatgt gccgattaca gcgctgagtg 50400

aagacagtca gccagcactg ctgcgggctc gaattcgccc gctgagttaa ccagttgttg 50460

cctgaatccc tggctgtcta ggggagcagg gccaggctgg ggcatcctga gcaaacgcct 50520

cccagtgcag gggcttctaa gtgcagttaa gtttagattt ggttttaaag aaggacaga 50580  
 ctgccctctgg actgcagccc tgaaaaactg gaagttgaga tcttcatgtg cccctttggc 50640  
 gtccccagcc cctctggatg gttctctgtc cctctcttga gggtagatg ctgaaggctc 50700  
 tggcgtatcc ctccctgcac cacaggagtc ctgcccatgg ccagaagagc cagcagacac 50760  
 aggaggggac tcgctaaacc tgggggtccc acagccaggc agctgttgtg cctgagtgcc 50820  
 agggaggggtg gccacaggtc tgcctggggc ctgtgatata ggcaggtag acgagaccca 50880  
 gggaaggaat ccgtctggat cttaccccag ccactgaagc tatttcctct ttgggcttta 50940  
 tcttagataa ctcagagatg tccacctgtg tgtaaaccag catcagagcc tgaaacacaa 51000  
 catgcatgga gcatgggagc ttggcttccc ggcttccctt tggcaccaca cagaggccac 51060  
 cccacagcc tgcccctgta tagtctcccc cacgtggcac gtgtgcctgg accacagcca 51120  
 gagagactgg ggtgccagg agatgatgat gggggctggc ggtgccagg aggggagctg 51180  
 ttgccagggt gggctgcagc cctgggctcc tctctccacc caggcactgt ttgctggcat 51240  
 gtacacggca ggcaactgtc tttgctcagc tgtgctcggc tgatggctcc cgtacaccgc 51300  
 agactcagct acacaagtcc ctgcggattg tccctctgtt gagtgccagg cagcaggaaa 51360

gggcagaaag caagaaccaa gctggggatg ggtgggagca tcctaagcct ggtgagaggg 51420

aaggggcggc tcctcctgga tgccctcigt gctggtgtgg gtgcagctgg ggcttagggg 51480

ccgcggtggg tgtggatgct gcccgggcga gggggctgcg gtgggcccat caggactgct 51540

ctcagggatg cgccttgctg cagctgcgtg aaaccaagtt tgtggctatg ctcttcccgg 51600

tggggatggg ccagcagtg accctggcat ccacatgcct ccatgctctc aggggtggagt 51660

ggccatccct gagcaggtga cacggatcgg agggccctct ttgatagtct aacacctttt 51720

tattttagt caaatttagt ttgtaattaa tgacatcaag agagacccaa atctgcctcc 51780

attgtgagtt tgatattttt tgaagtgggg ccaagatgaa cattcatgga gctcttccta 51840

tgagcgggtg ctgcggcctt cccctccaca ccacgtggcc ccgggcgtgc gctgctgctc 51900

ctgagacagc actgttggct cagccctagc tcatggtggt gctaacacct cacagaggcc 51960

aggccagagt agcaggaggc agcgccctgt gcttaccac cagcctggtg cccacgctt 52020

ggcttgaggg ctagttcaca ctatgtcca gagccacag ctatctgaca ggccagccgg 52080

cacctgcata catggttgtc caactgggtc ttgttaccat gacaaattca gtacttaatg 52140

attagaactg agtggaaacc aattaaaaa aaaagaacaa catggtgaaa agtcttctag 52200

agataggtca gcaccattta tgcatattac catgcaccct ctaatgtctg caggtgccct 52260

ggggcagcca acctgttaca attgcaatta tgtaacaat tgtaaaggg ccgggtgagg 52320  
 tggctcatgc ctgtaatccc aacactttgg aatgccaagg tgggaggatc atttgagccc 52380  
 aggagttaa gaccagcctg agcaacagag tgaacctct tttcaaataa ttaataataa 52440  
 taataataat aataattgtt ttttgtttgt ttttgagacg gtgtctagct ctgttgccca 52500  
 ggttggagtg caggagcgcg atctggctca ccgcaacctc caccitcccga attcaagcga 52560  
 ttctcctgcc tcagccttcc aagtagctgg gattacaggc acccgccacc gcgcccagct 52620  
 aatttttgta tttttagtag agacagggtt tcaactgtgtt agccaggctg gtctcgaact 52680  
 cctgacgtca tgatccgccc gccacagcct cccaaagtgt tgggattaca ggcgtgagcc 52740  
 actgcacccg gtctaataat aactgttaaa gcaataatga ccactcgcca cagagcacgc 52800  
 tccttcctgg gggtcctctg ggcctgagct gggggctgcg ccgtactcca aggctgactg 52860  
 tggggcttta cacatcataa tgcacatagg cagcttgagt aggaaaggcc ctatgctgc 52920  
 ctgaggggaa gtcacccca cccccaagg agccgccctg ggtatgagac atccctggaa 52980  
 cggcctaagg ggtccctggt ggctgctggc agtcacagca agtggccaat caggtcccat 53040  
 tgaggcccag gggctcactc atttattcaa ctaacatggc gtctcgatgg gacctgaggc 53100

cagcagggca ggtgcgtccc ctccccctg gtgggctcat agctgcgggt aggggcccgg 53160

ggctcattga gaaggcgcga ttccagaaaa aaaaaaaaaa agaagataaa tattttaaaa 53220

taataagctt caagaatcta agtccagttc caaaggcata cgctcctctg tgcctgggtcc 53280

aaggcgcctc actggggcaa gtggcaggcc agggcccgtg aggggtggctg gctctggggg 53340

ccacatgcct catgagacag tcgccagggt gccacaggg cctgtgtgtg aagccgtgcc 53400

cgctctgcat cggccaccgg cctggagcc tccactccc acaccctgt cctcaggcgc 53460

agtgccttggc cctggctgcc tctgtctgga tcacagccac tggtcaccc tgctgtactc 53520

ctgctggcac ttacctctca cctggggcgc tgccctcctg ctcttctctt gggaaaatgt 53580

gtcccaggcg ggcgtgaaat cagagggcat gcctgttctt cccatcatgg atgagagagg 53640

cgcatgatac tgcatgcggc tggccgtccc cgtgtccctg tgtccatcag aatagatggg 53700

agtgacccat ggtgactgtg tgggtgggtt ttgggcttca gccttctctg gtccctcctt 53760

ggggccaggc tggctggaca agcatgggtg ctgccctcca tctcctgggc cattgacagc 53820

agctgggtggg gctctcattg tgatcagagg agggctgccc tgcacggctg ttcttagcac 53880

tggccacaca tggagatggg ctgtcctgcg tcaggggtgc tgcactgctg ggcctggggc 53940

tggaggcagc tccgggctgc agagatgctc agcccagtgc ttcttgagtg tcagtgttgt 54000

gggccagcca cacatataca taggaagtga gcacgtccat ttgtacctgg aattactatt 54060

tttttggcag aaggacaaac ttgttgggc ccatcagccc caattctgaa ccaagtcag 54120

tgggcagcaa tgagaccac ttgtctacca gcagagacat ctctgcagtgc gcaggttcgc 54180

caacgtgcca gtggttgcca tctctgaagg gacgttcctt ggggcttgcg gccatactct 54240

gcaccatggt cagcagctct tctttgcctt atatgtagtgc ggcatggcct gccttcagga 54300

tggctgggtca gticggccac ctctggctcc cacattgacc acagctctgt tggctgagat 54360

gacctcttg gagggcagct tcatgtaagt ctctctggtt tccgggctag gggaggtagc 54420

tgcggtgtag ttctcaaagg cccaggctaa caagttccag tctcagctc tctccaggc 54480

agcgttgat ggtacagggtg tggcgcctgc agggaggacg ctgccgacgt ccagctgggc 54540

cctcttgcta cagtacacaa acagaaattg gcccggtgtgg aggcccttgg tggatgga 54600

cagctcgtc tgctgcttaa actggtgtgg atcctggaga ccatctcagc aggggcatgt 54660

ccttcaaggt gcccttgatg tagctgtgcc gctcagctaa gtccacagca tgcaggccta 54720

tgagccctcc tgcttcatgt gcacaaggaa cacagagctg gtgcccttcc tctgccacg 54780

aatcccgtgg cccacgactg ctcatgaata cagcctgaag agctgtacct ggaattttaa 54840



tgcccttgtc gtttgcagaa aatatgccag agtgtcatgt atccattacg taataagctc 54900  
 ttacaaagaa ggaacatggt gaagatgcct ataaatggat gagaaaaggc aggaactggt 54960  
 aatttacaaa agaggaaata cagttcataa acacgtggcc aaaaattact tcattcttact 55020  
 agtcatcaaa gaagtgcata ttaaagcagc atgacagaga gtgctgtgcg ccgcctgccc 55080  
 caggaaggaa cagagtctaa ggactgccct gcgcccagaa gccccactc agctggccgc 55140  
 ccttcctttg agggctctgcc ccaggaactc aactgacaca tggcaagctg gtgccccagg 55200  
 tctccatcct ggtgggtgtct aggaagcaga gccttgagag tgcctgtcct accccaggag 55260  
 gggccattca gcagcacttg gcaaagtctg cactgggcac tccagagcca aggccttcgag 55320  
 gacggagctg caggagcac agagccgccc catggggagg cctgcagtgg gccacaggca 55380  
 cagctgggaa agctctgagc acaacatgca gggcgaaaga caccggtgca ggcacccttc 55440  
 tttccctaaa tggcctgaat agtgcacatt tatcctggca taggaggga atggtcggga 55500  
 gctgaccagg cacaactgct ttatcctggc ataggaggga aatgggtggg agctgactgg 55560  
 gcacagccac ctgcatcctg ctgctcacag cattcgggcc ccagtgggtc cccaccttgg 55620  
 cacaagtcgt ccaacctcct gcagggtcctc aggcctgagc cagtagggcc taggacgcct 55680  
 gattggctgt ccagcaccag caggagatc tggcccttct ctggccactg cccagtcctt 55740

tgctcagcaa gacccatagt ggggctcagg gcctgggtgtc ctgccatcag ggctggccac 55800

ggctagggac gtggcccccac ccaagtggag ctggcctctt cctgcaccc actcccagcc 55860

acgtcccacc agcccagctt ctaaccccac tgtgccctcg gctgccctcc tcagggtga 55920

gcctgtgcc tgccacaggc cactcactct tcttttgctg ttcattcccg aagggtgtg 55980

gagtcctgc agggccaggc gtgtctgtgc cgcgcagccc actctcccct ggccatccag 56040

cctgtccagc tgtcatgcct ttcacattag tggctccatt acattcccac cgacttccca 56100

gagtgatcca cagagcatgt gcggaagagt cctggctttg gatgggccac ctatttccat 56160

gcctctttta tctcttgtga ctacttttaa atttatcttt atttccttcg ggacctgggg 56220

acagggtttg gtcagcacct gcaaggctcg tagttgccat agtgccatag ttacatgag 56280

gaacatgatg agtgctcttg gcttcccagg accagccagg caagcgtgca gaggagagt 56340

tgggtgcagc gtcagatgtt ctgttccggc acggagcagg caccaggaag tgctgggcct 56400

ggtagggctgg acaccaggtt ggagaggac cagacggctg agcgtgagcc cccggcctgc 56460

agggaccaca gcccctcctt cgtgccccag ccctgcccac ggggccagc tccttcctct 56520

gatgtgggct ggcatcccct gtgtctgggc tgatccccga ccggtgccag ccttcccggc 56580

acccaattcc tgcggctgag cagagcacag aggctggagc cggcctcccg caagctggct 56640  
 tagccaagtt ggtatgtttt gactcctgcc ccgggacagc agctggagac ttaagggttc 56700  
 cctctcacgg gagcttcagc ttccagatgc ttaggtgggc gccacccgca taccggccag 56760  
 cagctggttt gtcccagcca cgatgagcag gggagctatg cttttgaggc aaaattgcct 56820  
 tcgccattgg tggatcatcc tgagcccctg ggagccgaga gcacctgggg ttgggagga 56880  
 aaagctgctg tggccatccg ctggcctggc aaaatcacac ccatctgagt taggggagaa 56940  
 aggacctct gctggctgtt tggctatgaa gaggcccatg cggtgccctc tctccgggcc 57000  
 ccaggctgtg tggagactgg cagggggcag ctgtgctgac cccctggact ggccatcccc 57060  
 tgcccccttt ggcctttgca cccaagagca ggatcagctg agccagctgc cccctagaat 57120  
 gggcacggtg tagtttggac actgccccct agctcagctc cccttgccc tgaggtctct 57180  
 aggctgggac tgtgtgccag gcagccacga ggggctgcag cacagagcag gtgggagacc 57240  
 cggctgctag ctctgctcac ctggccctct actagcgggt tacgggggct tgctttctcc 57300  
 taatggggag agaccttcaa gccctacctg ggcagagggc cagatcccag gacttgagca 57360  
 ttgttggggt acagtccagg gtgtggctgg ctccctctca gcttgtccag atagggagga 57420  
 ggccattggg agccagcagg tgtcccttga aggaggcccc tctggactct tgaggcctgg 57480

gagctgatgg atctcactgc ctaatggat caggctgtgg tgctgcagac agatgcaggg 57540

aggccaggca ggccagggtgc caacagctcc ccatgaaggg ctggtttctc cggatgaagt 57600

cagtaccaga gccactggca ctgtgctggg ggccctgcag cagggcctga ggccctgggca 57660

tgcggaagat tctggagtcc cgcgcttagc actctttgat gtcagggagc cccagcattg 57720

gcaagtgcct ctccctttcc cgcgtgccag gaaccagtct aaggccgact ccagtttcca 57780

ccggtggcac ccctgccttg tctcctgtgc cggctgtcat ctgaccagtg tccgtttcag 57840

acctgcctgc cacctcctgc agaggccagg agccccctta cgctgctggg gcttcacatt 57900

tggccagttc taagtggaca ttcttttttc ttgagacagt ctactctgt cgcccaggct 57960

gaagtgcagt ggtgtgatct tggctcactg caaccgacac ctcccgggtt caagcaattc 58020

tcatgcctca cctcctcaag tagctgggat tacgggtgca tgccaccaca cccagctatt 58080

tttgtatatt taatagagac agggtttctt tcttttctt tcttttctt ttttttttg 58140

agacagagtt ttgctcttgt tgcgcaggct ggagcgcaat ggtgcaatct tagctcactg 58200

cagcctccac ctccctgggtt caagcgattc aacctccga gtagctggga ctatagggtg 58260

gcaccactac gcctaggtaa ttttgtattt ttagtagaga tggggtttca ccatgttggc 58320

caggctggtt ttgaactcca gacctcaggt gatccacttg cctcggcctc ccaaagtgtt 58380

gggattatag gcatgagcca tcacgcctgg ctgagacagg gtttcatcat gttggccagc 58440

ctggtctcga actcatgacc tcaggtgatt tgcccacctc gtcctcctac agtgctggga 58500

ttacaggcag gagccactgc acccggctc taagtggaca ttctgagaaa cagtttaaac 58560

acaaccgctc taggtcaaag ccactgaaga taaccttca gccccctc tgtttcctc 58620

aggtcgagtc ccagacacca gaagtctgaa ttiggagaag gctggggtag atactagccc 58680

cgacactcag aagatcctgg tggactcccg ggaagccacc tctgtgcccc acatctacgc 58740

cattggtgac gtggtggagg tacggcatgc gtcccgggac cagggccctt gccctgcct 58800

gtccaccac cctgctcgc tgggctccgg ctgctgccgt cctgtaggag agaaacgaca 58860

ctttctctga tgacagaggc tctgggcca accccagggc cagcctgtct ggagttctgg 58920

ggcaacctgg acatgggcct cggctctctg cctttccttt cctttctgtg gtgggagtgt 58980

ggatggtcta aagacagctg caagcaccag cagcagacgc ctgctgggaa tggggcatgg 59040

gtcagctctg cacgcaggcc tcaaccctg gcaggtaggc tagaggcata ggcttagaaa 59100

tgccaccatg gccttggggc cgtcctgtcc ccacagggtt gagaggcagg tctagtctcg 59160

gcccacctgg ccccgccctc cccgcctcag tctcctctgg ctgcctctc tgggcatcac 59220

accggggcag gtcctttgct ctacgtgct gctgctgctg tgaagtggag accggtgcca 59280

gtctttcctg ggtgggggct ctggagccct ccttacacat ggccccagta agggactgtg 59340

gtggtcagtc ttgggatact gcaccctggc agcctcagga gtgctcggcc tgcctgcat 59400

gtgtccagca cctgctgctg aaagtggctc tggagggtcg ctgagagctt cttttagcg 59460

agacctgtca gtgtctgct cctggggctg tggtaacaaa tcaccacaca cgggtggccc 59520

agaacaacag acatggatta tctcacgttt ggggggcagt agtctgaaat gaaagtgtca 59580

gctggggctg ggtgcagtgt ctcatgcttg taatcccagc actttgggac tccgaggcag 59640

gcagattact tgaggtcagg agttcaagac cagcctagcc aacatggtga aaccgtctct 59700

actaaaaaaaa taaaaaatt agccaggcgt ggtggcacgt atctgtaatc ccagctaccc 59760

gggaggctga ggcaggagaa tcatttgaac tcgggaggag gaaggcggag gttaccgtga 59820

gccaagattg tgccactgca ctccagcctg ggtgacagag cgagactcca tgtcagaaag 59880

tgtcagctgg gccaggctcc ctcggaagcc tctggggtag gatgccccag gcgtccctcg 59940

ggttgtggct atatcactcc tctctctgcc tcacgtcat gtgacagtct cctgggtgtg 60000

tctctgggcc ctgatttgcc tcttacagtt tctctgcaat tggacttagg gtccacccta 60060

atccaggatg acttcatttc catccttacc ttaattgtat ctgcaaagat cttatttcca 60120

aataaggica cacctcgagg ciccaggcag accctgcagg gtcctgtagg gcccatctag 60180

ccgacccgat tgtgtggaca gagcatgtgg ccccatgtgc ctgagccacc ctgcagcccc 60240

agcttgctta gctggatggt tcagctgctc agtgatttct gcaagcgag cctctgcctg 60300

tggaccaatgt aggtgcagtg gtccttggtt gcagggtctg ttgaatcctg tgggcgctgc 60360

accctgagac agtgccatgt gcatctctgt gcacagcggg aagcctccct tctgtctggg 60420

aatctgagtt ticcctctgc aagtgtgtag ctcccaggct cctgtgttgg aaactggaac 60480

atticaaacc gtttggcag aaatgcatgg cgcacacaaa ggcattcttt atttaaacad 60540

taaatccact ctgtcagaaa ggctgttctg aatagtccaa agagttaaca cccaaccagt 60600

ggtccttga gcggctggga agagcctgtg ggCggggcgg gggctattgt ttaatgagat 60660

gttgigtgct gtgcgccgcc cgccgggatg tttccgtagt tagtcaggcc tgctggaatg 60720

cgcaggctgc gctctgagtt tatctccacg gatctctatg catttctgga atgccaacaa 60780

acatctgcat ttctgtctgc catggtgatt ggcagcccat cccagaggac ggtgctggaa 60840

cccccaaggc tgggcacacc ctgggacgga gggatctcca gcacagcgac attctgattt 60900

ggaatttggt atggactgtg acgtgcagat caagctgcac gtcaggagca catggaacgc 60960

tttggggtcc ctttttagcc ggggattcca gtgaatgaaa acggtagcag gggctctttt 61020  
 gagcttggtc atggggcagc cctccgaggt cagcaatgtg cagaaggggt ttggagagaa 61080  
 ggcttgagca tgtgagggtg gcacggccag cctcatcagc agcggactcc tttcccaggg 61140  
 cagagtggag ggcagcaaac aggagaaatga gcaacctacc taggtccttg ggatgcccct 61200  
 caggaggacg agctctaggg ggaatgctgt acgtcaccat gctcgggtgc agtgttgggg 61260  
 attttctaaa gggagatgcc cactcggagg gcaaagggtg atggcatagg ggctgcatat 61320  
 aaccccgac atgggtctga cgtggcccc ctgtgccttc cccaaggggc ggcctgagct 61380  
 gacaccaca gcgatcatgg ccgggaggct cctgggtcag cggctcttcg gcgggtcctc 61440  
 agatctgatg gactacgaca atgtgagttc tctagcagga cgccacgtgc agcctaggac 61500  
 aggctgagtt cgaggctagc tcttctgggg tgaggggcct ttgtgcgctg tgtgtctgca 61560  
 tgtagatgtg ggcatgcgtg tgtgtgcgct tatgtgggtg tgttgtacac acgtgtgtgt 61620  
 gcatgcatgg gtgtgtggct cagttctgag agtgtggcgc aggcgtgggc aggtgggtcg 61680  
 cctactgtgc ttgcagcctg ctctgggcgc atctggtcct ggtctgtgat cgctgctctt 61740  
 tgtgtcacat gcagtgggga acttcggttt tcggggccca agggccctcc ctgactccag 61800



acctgctttc aggttccac gaccgtcttc accccactgg agtatggctg tgtggggctg 61860

tccgaggagg aggcagtggc tcgccacggg caggagcatg ttgaggtgag gcctgggagc 61920

agcacagctg aggacagtgg cgactccacg acctacccc atgctctggg cggaggcctt 61980

gtgagcaggg tgccaaggtc tctcctttcc aggggccctg agcagtggct gtgtgtagcg 62040

ggaagggaca cgttgggggc agcctcagaa gtgggggtgc ctgggctttg gcagccttgg 62100

ggtgactggg cttaggtgcc tctggctctt gccacatgt gtcacagcag tgagggggaag 62160

gcccttggct gccttgttct gagggcaagg agaagccctg tggcccagaa gccccagcc 62220

ccacccagc catgctgcag gggtgcccag caccagcagg gtcaccacca cgggtgccacc 62280

cgctcccctg ctgaggtcag ctgagcactg gcccactcc agcacacagc agcttgtccc 62340

tgaaagcacc agggccccga agatgcctct gtgctgtccc caccttgcag ggccatgaat 62400

ctcactctac ccagaaaagt ttctcccagg ggcctccgac ctctgcttcc acccccaccc 62460

ccccaccac cctgcacctc gtcttccctgg actgcccagg gtttctccca ggcgagagcc 62520

ccccgcccc cgccccccac cacatcctga taccatcct ctccagctt ctccaggct 62580

caggcactca cccttgagga aaggggtttt catcgagcaa gcctgctttg ggggtctgct 62640

ctggcaggtg gctgtggctc cgggggtggcc tggagggatg cgggggctct gaagcctgcc 62700

gggccgtggt agctggaagc cticggigcg gtttcatctt gctgccgctg cagcttgcag 62760  
 gcacccagag aaaccggagc ctgcagcctg ggcggtgggg cctgcggcct ttggggatga 62820  
 gacactgggc tccagggctg gccccttccc cctgcacccc agaactctcc atcaacagga 62880  
 cgggcctgac aggccagcct tccccgaggc actttatttg ctatttttgt ttgattcatc 62940  
 acaagtgtgc tgggacatat gttcctggca ttttataatg ttgttttatg tttcacaatg 63000  
 ttgaatggcc aaatactctg tttgttttct tttcaattct gtcttagtta gaacaatatt 63060  
 ctctgaagtt ccattaatta ataatggctg tacagcacat gtgaggggccc cactcatttt 63120  
 ttacttggcc gcagccccgg acacgctgtc gagcccttca ggggtgctga aagcctttgt 63180  
 ccaacagctc cggctccggt gtggccacag cggccttgct ccagtgaggg ccaagcaaac 63240  
 accaggggtc ctgaggggagc ccaggtggcc tcctgtcac ccattcttgc ctccaccatt 63300  
 tgttgtgggt gagctacgtc caccaggtt tgctgtgcct ggcctggctg ctggattgc 63360  
 ctgatgcctg ctctgtctgt gtggtttacg ggggtcccag gcctgggtgg gacagggctc 63420  
 gtcctgcaga gcatggctcc agccactggc tgcctgcacg tgagagggcc tgcacacacc 63480  
 ccgtggccag ccaagccctc atccccatcc cagaccagac cticaggcca gatggatggt 63540

tcctgcccgc catgaccctg ccttgcccat gcagcctgtg ggagctgcag gtgccacgag 63600

gtttgtttgt cgcagcactg atccaggggtt ggtatcctgt cctcaggtct atcacgccc 63660

ttataaacca ctggagtcca cgggtggctgg acgagatgca tcccagtggt atgtaaaggt 63720

gagcatccct gtggcccagg gtgctgagga tgagagggag ggtggcaaag agcctggcag 63780

ggtgaacacc cgaggactgg cccacccat gcccccagg cagggtgcag ggtggatgca 63840

gggtggacgc aaccagccc cctcctgggc tgggtggctga gatgtcggc ttcagatgg 63900

tgtgcctgag ggagccccca cagctgggtgc tgggcctgca tttccttggc cccaacgcag 63960

gcgaagttaac tcaaggattt gctctgggga tcaagtaagt cccgaggaat gcaggctgcg 64020

atgcgatgtg cagctgggta tccctcgagt gccggcagtc ctacagtga gagctgctgc 64080

cactcttgcg gcatttatgt ggccttcgtg ggtttgcagc agagattcct caggcccctc 64140

agacagggcg ggttttaggg ggacaagagg cggttctgcc ccagccagac gctgttgagc 64200

cagccagagc caggtgaggt gtcccctgtg gccccgggtc gctgctaggg cccttgccca 64260

cctggccaag caccacgcca ccatgagcag agtgccagta cctggagagc caccacagg 64320

ctgctgtgtg tcttctggag ctggggccat tgccctgggtc ttgggctcag gctgtgtgtt 64380

ttcggggtcc cggggtcaaa ggaagccatg gcaaaggctc tgggtgggtt gacaggggta 64440

gttgagggtt gggacattgt gcatggcctg agagagggtg ctggctggat gtggggcctg 64500

ggagggtggtg gtgtggtgag gccaggatgc gctgtctgtg ggtaaagcag agagcagagg 64560

cctaaggcag gactgtgcct agcagggggag gatggaacag caggaagcca ggccagggca 64620

agccaggggcg tggctgggtg ggagggtggc tggacgagca ctaggcatct gctgggaggg 64680

aggtggatgg caccacggtg tgtgggcagg ggtcctggct gctggctggg ggtcagggga 64740

cagtgaggag accagcagcc tctgaggccc tctcttccc ggggggtggga tgctgtggac 64800

ccccctccct gtgctgaccc cgcctgcctc ccccatcccc catgtgcagg tgtggggctt 64860

cctatgcgca ggtgatgcgg accgtgggta tccatcccac atgctctgag gaggtagtca 64920

agctgcgcat ctccaagcgc tcaggcctgg accccacggt gacaggctgc tgagggtgaa 64980

cgccatccct gcaggccagg gcacacggtg cggccgccc cagctcctcg gaggccagac 65040

ccaggtatgc aggtggggct ggctctgttt gaggacaggg catgtggcag gggtgcagga 65100

gccctggcca tgggtccct ccaggtgtac agcaaggcta cacctgccac gccacccaga 65160

atgggtgctc catcctgtaa ccaggccaca gcggtgacag gcagaagggg aagttcccag 65220

gggccccaaac ctccccgggg gacccagac cccggcctgg ccacagctgc tccccacaca 65280

caggaggtat caagaaacgg ggctcatcct tagcagccta tcccaggtgg atgttggcgt 65340

ggaaggtgtc ccgggtgggc taaagtcggg catctcaagt tgctgcccc aagggggctg 65400

cagtcgggaa gctggcctcc caccgaggcc tcccaccaag gcctggctcc tgcagagttc 65460

agcgcccgct catttcccta tctcccagaa ggtggagacg ctgccctgtg atggccggcc 65520

ctgccagcc tgccctgcac atctggttct gticcagctc tgcagagcca ggctgaccgg 65580

ggggcatgtt gticacgtg acctcttctg gggaggaaga aactggcaag ggctcctggc 65640

ctctgcccc gggatgcctg tgccagagcc ccctgcctc gtggtctaata agtgcacct 65700

ccggcctggg ctgcaggga ggggccggg cagggtgggc cctcagccc tgccatccag 65760

cccacctggg gcacccccat ggctgtcagc ccctcccagg gttgggggtg ttgggctcca 65820

tctctcccc ggggctgagg tggagaccag gcagagcagt gggctcccc caagatgcct 65880

gtggacaggc tctaggtct gcatggcgcc gaggggctct ggggaggcct ctctgggggt 65940

actcagggcc ccctgcttca ccgtggccgc ctccccccgg cggggccgcg ctcgataggg 66000

ataaaciaag ggcacctga ggaaactctt atcagaacat tacacctccc agagctgttt 66060

tgtaggagc ctgtataaa tttttatcat ttcaaaatat tttttagca ccgcgtcgct 66120

ccctgtgacg catcgccctg ggggtgggcc attctctgct gggtttattt ctacccatc 66180

tcccttgggg gtccctgggt gtggcagtgg gagacatagc taggctgatg tgaggggtgg 66240

gtggctgacc tgtgctgacc ttctgttgt tggcaggatg gctgcaggcc aggtttgggg 66300

ggcctcaacc ctctcctgga gcgcctgtga gatggtcagc gtggagcgca agtgctggac 66360

gggtggcccg tgtgccccac agggatggct caggggactg tccacctcac ccctgcacct 66420

ttcagccttt gccgccgggc acccccccca ggctcctggt gccggatgat gacgacctgg 66480

gtggaaacct accctgtggg cacccatgtc cgagccccct ggcatttctg caatgcaa 66540

aaagagggtg ctttttctga agtgtg 66566

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるTxRⅡαと、公知のTxRとのアミノ酸配列のアライメントを示す図。

【図2】マウス抗TxRⅡα抗血清を用いたウエスタンブロット法による各種培養細胞株におけるTxRⅡsの検出結果を示す写真。

【図3】各種タグを融合したTxRⅡα組み換え体のDTNBアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

【図4】各種タグを融合したTxRⅡα組み換え体のインシュリンアッセイによって測定したTxR活性を示すグラフ。縦軸は340nmにおける吸光度の変化量を、横軸は反応時間を示す。

【図5】TxR活性阻害剤がflag-タグ融合TxRII $\alpha$ タンパク質のTxR活性に及ぼす影響をDTNBアッセイによって測定した結果を示すグラフ。TxR活性阻害剤には、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)と13-シス-レチノイン酸を用いた。縦軸は412nmにおける吸光度を、横軸は反応時間を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

```

1'  MAVALRGLGWRFRWRTQAVAGGVRGAARGAAAGQRDYDLLVVGGSGGLACAKEAAQLGR
    *****
1"  MNGPEDLPKSYDYDLIIIGGGSGGLAAAKEAAQYGK
    FAD結合領域 (ADP)

61'  KVAVVDYVEPSPOGTRWGLGGTCVNVGCIPKKLMHQAALLGGLIQDAPNYGWEVAQPVP
    ** *.*.*.*.* *****
37"  KVMVLDFVTPTPLGTRWGLGGTCVNVGCIPKKLMHQAALLGQALQDSRNYGWKVEETVKH
    還元活性中心

121' DWRKMAEAVQNHVKSLSNWGHRVQLQDRKVYFNIKASFVDEHTVCGVAKGGKEILLSADH
    ** . * ***** . *****.*.*.*.* * * . * . . . . * * . * .
97"  DWDRMIEAVQNHIGSLNWGYRVALREKKVYENAYGQFIGPHRIKATNNKGKEKIYSAES

181' IIIATGGRPRYPHTHIEGALEYGITSDDIFWLKESPGKTLVVGASYVALECAGFLTIGIGLD
    ..*****.***** . * * . * * .***** * * ..*****.*****.*****
157" FLIATGERPRYLGI-IPGDKEYCISDDLFLSLPYCPGKTLVVGASYVALECAGFLAGIGLG
    NADPH結合ドメイン

241' TTIMMRSIPLRGFDQOMSSMVIEHMASHGTRFLRGCAPSRVRL---PDGQLQVTWEDST
    .*. * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .
216" VTMVRSILLRGFDQDMANKIGEHEHGIKFIRQFVPIKVEQIEAGTPGRLRVVAQSTN

298' TGKEDTGTFTVLWAI GRVPDTRSLNLEKAGVDTSPDTQKILVDSREATSVPHIYAIGDV
    ... * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .
276" SEEIIEGEYNTVMLAIGRDACTRKIGLETGVKINEKTGKIPVTDEEQTNPYIYAIGDI
    FAD結合領域 (フラビン)

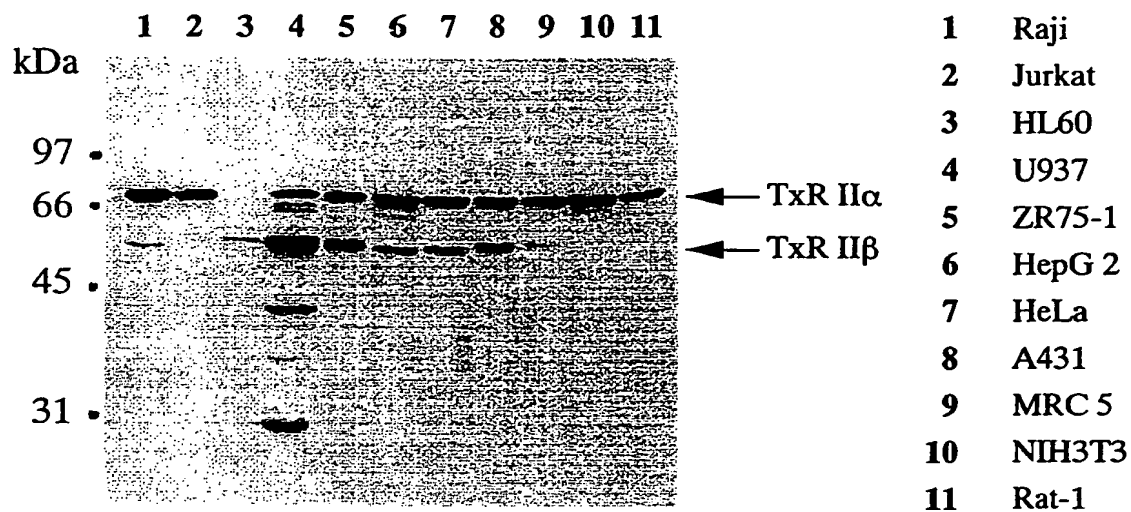
358' VEGRPELTPTAIMAGRLLVQRLFGGSSDLMDYDNVPTTVFTFPLEYGCVGLSEEEAVARHG
    . * . . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
336" LEDKVELTPVAIQAGRLLAQRLYAGSTVKCDYENVPTTVFTFPLEYGACGLSEEKAVEKFG

418' QEHVEVYHABYKPLEFTVAGRDASQCYVKMVCLREPPTAGAGPAFSLAPTQGEVTQGFAL
    . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .
396" EENIEVYHSYFWPLEWTIPSRDNNKCYAKIICNTKDNERVVG-FHVLGPNAGEVTQGFAG

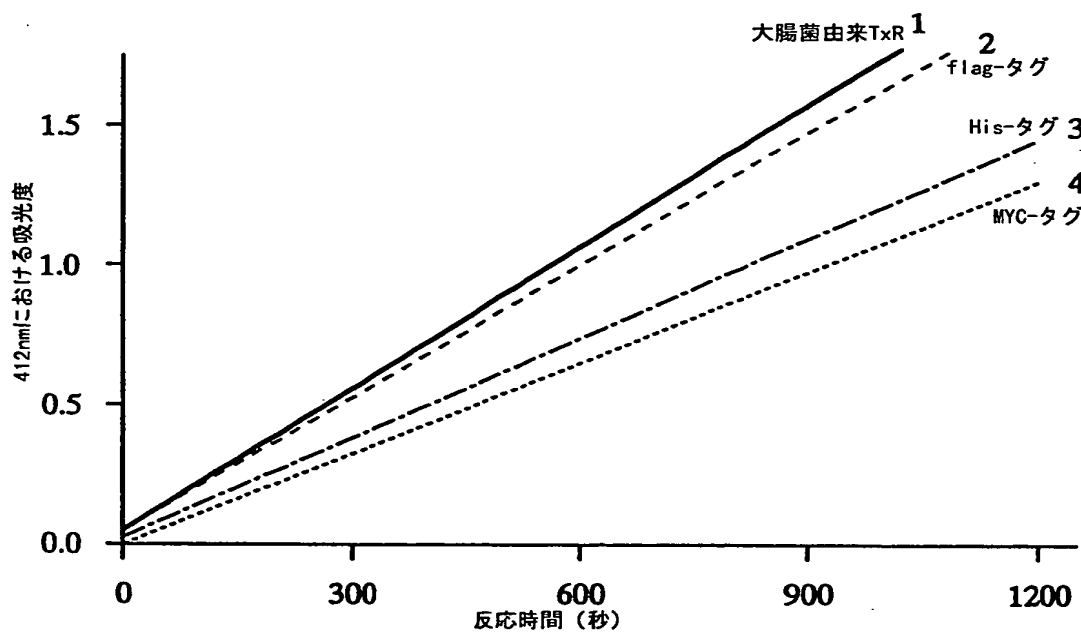
478' GIKCGASYAQVMRTVGIHPTCSEEVVKLRISKRSGLDPTVTGCSeCysG
    ..***** . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .
455" ALKCGLTKKQLDSTIGIHPVCAEVFTTLSVTKRSGASILQAGCSeCysG
    
```

【図 2】

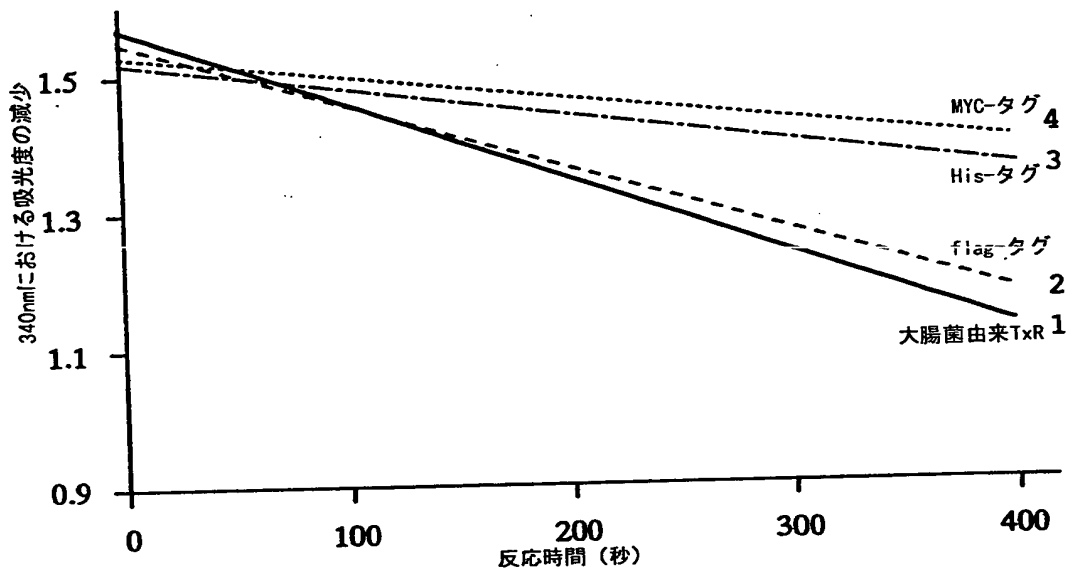




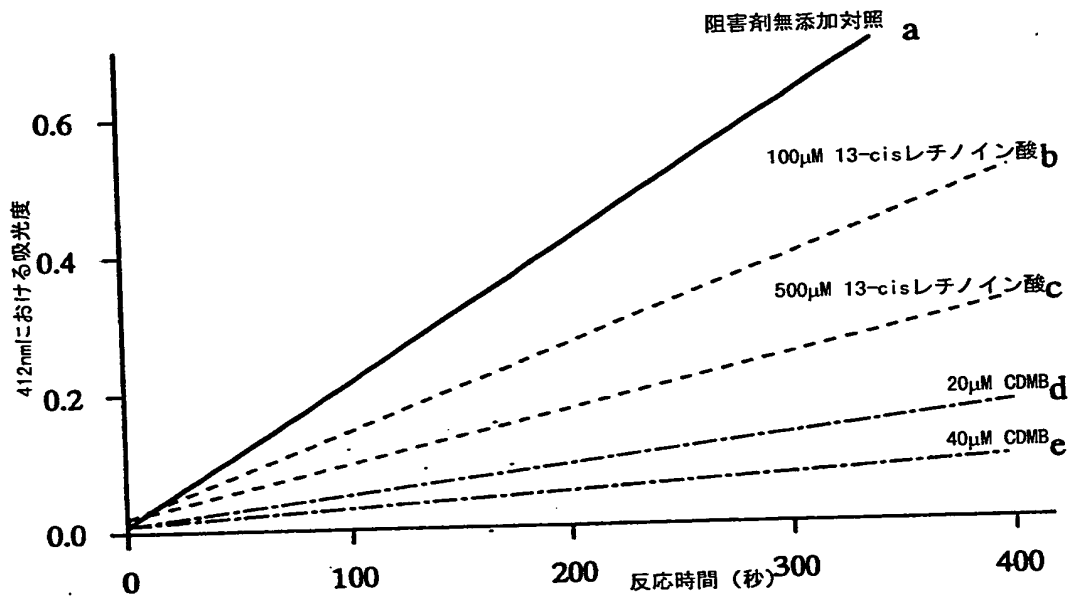
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、ヒトにおけるアポトーシス阻害タンパク質XIAPの結合タンパク質とこれをコードするcDNAの単離を課題としている。

【解決手段】

XIAP結合タンパク質、ならびにそれをコードするcDNAが提供された。チオレドキシンレダクターゼ活性を持つこのタンパク質を、チオレドキシンレダクターゼII (TxRII)と名づけた。更にTxRIIにはオルターネイティブスプライシングによるサブファミリーTxRII $\alpha$ 、ならびにTxRII $\beta$ が存在することを明らかにした。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

390004097

【住所又は居所】

愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友  
商事丸の内ビル5F

【氏名又は名称】

株式会社医学生物学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階  
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390004097]

1. 変更年月日	1998年 7月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5F
氏 名	株式会社医学生物学研究所

